

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



*Regulación del factor de transcripción Nurr1
mediante cambios en su localización subcelular y
su estabilidad por estrés oxidativo*

ÁNGEL JUAN GARCÍA YAGÜE

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

*Regulación del factor de transcripción Nurr1
mediante cambios en su localización subcelular y
su estabilidad por estrés oxidativo*

Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor
presentada por el Licenciado en Bioquímica

ÁNGEL JUAN GARCÍA YAGÜE

Directores de la Tesis:

Dr. ANTONIO CUADRADO PASTOR

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Dr. ISABEL LASTRES BECKER

Doctora en Ciencias Químicas,
especializada en Bioquímica

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina
Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”
UAM-CSIC



Antonio Cuadrado Pastor, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por Ángel Juan García Yagüe, Licenciado en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, para optar al grado de Doctor, bajo el título: “Regulación del factor de transcripción Nurr1 mediante cambios en su localización subcelular y su estabilidad por estrés oxidativo”, se ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica e Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

Considero que este estudio experimental es satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, expido el presente certificado en Madrid, 5 de Mayo de 2012,

Fdo: Antonio Cuadrado Pastor

Catedrático de Universidad

Departamento de Bioquímica e Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid



Isabel Lastres Becker, Doctora en Ciencias Químicas, especializada en Bioquímica, del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por Ángel Juan García Yagüe, Licenciado en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, para optar al grado de Doctor, bajo el título: “Regulación del factor de transcripción Nurr1 mediante cambios en su localización subcelular y su estabilidad por estrés oxidativo”, se ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica e Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

Considero que este estudio experimental es satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, expido el presente certificado en Madrid, 5 de Mayo de 2012,

Fdo: Isabel Lastres Becker

Contratada Ramón y Cajal (PDI) de la Universidad
Departamento de Bioquímica e Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina e Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (UAM-CSIC) gracias a un Contrato de Titulado Superior concedido por la Universidad Autónoma de Madrid y con la subvención del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2007-62646).

**“En principio, la investigación necesita más cabezas que medios”.
Severo Ochoa (1905-1993)**

**En memoria de mi madre Juana,
a mi padre Ángel y
a Myriam.**

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración de muchas personas que me han brindado su ayuda, sus conocimientos y su apoyo. Quiero agradecerles a todos ellos cuanto han hecho por mí, para que este trabajo saliera adelante de la mejor manera posible.

Quedo especialmente agradecido con mis dos directores de tesis. El Prof. Antonio Cuadrado Pastor que me ha ayudado y apoyado en todo momento, con su gran calidad científica y humana, que me ha acogido en su grupo de trabajo y me ha abierto la puerta de este mundo apasionante. Le agradezco sinceramente su confianza y todo su apoyo, consejos y ayuda. Tengo que agradecerle sus comentarios, direcciones, sugerencias y las correcciones con las que he podido elaborar una adecuada memoria de todo el trabajo realizado durante estos últimos años. También quiero agradecer a la Dra. Isabel Lastres Becker su confianza y todo su apoyo, consejos y ayuda. Le agradezco de todo corazón las lecturas y comentarios, tanto científicos como literarios, de esta tesis, sus correcciones y su infinita paciencia. Además, su compañía incondicional y su amistad. No habría podido acabar la tesis sin su ayuda. Gracias a mis dos directores he participado en congresos, cursos y he recibido una formación que me ha permitido acometer este trabajo.

Por su especial apoyo, su ayuda en muchas ocasiones y por todos los momentos que hemos pasado juntos, por todas las conversaciones y los buenos momentos de amistad y compañerismo quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Ana Isabel Rojo Sanchis, la Dra. Nadia Giselle Innamorato, a la Sra. Patricia Rada Llano, que han sido unas compañeras muy especiales con las que he podido hablar del trabajo que llevaba entre manos y que siempre han estado dispuestas a colaborar y a proporcionarme la ayuda necesaria. Debo agradecer también a algunas personas que en un momento u otro han sido compañeros de camino y que actualmente no se encuentran en el laboratorio como son Rosa Ana Ramirez y Johanna Troya Balseca por haberme ayudado en todo momento al desarrollo de la presente tesis con su apoyo técnico. No me puedo olvidar tampoco de la Dra. Rosa Sagarra Conde por haberme proporcionado también toda su sabiduría y su laboratorio C-11 durante parte del desarrollo de esta tesis y muchos otros que, aunque no mencione en esta lista, estoy seguro que saben que quedan incluidos en ella.

También estoy muy agradecido al servicio de microscopía confocal, en especial a María Dolores Morales García y Ana Isabel de las Heras Núñez, por haberme ayudado a obtener las mejores imágenes para la realización del trabajo desarrollado y por los buenos momentos que hemos pasado juntos.

Quiero expresar mi agradecimiento a mi familia. Sin ellos no habría podido llegar a este punto. En especial a mi padre, Ángel que me ha dado todo su cariño, comprensión y su apoyo incondicional en los mejores y peores momentos, en unas dosis extraordinariamente elevadas y a mi madre Juana, que aunque ya no este conmigo, seguro que siempre me ha acompañado en todo momento y me ha estado apoyando y ayudando a lo largo de todo este tiempo. Tampoco puedo olvidarme del resto de mi familia, que me ha apoyado y comprendido durante el desarrollo de esta tesis. En este periodo tan largo y, en ocasiones, tan difícil, han logrado que siguiera avanzando hacia mi objetivo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi eterna gratitud a mi pareja sentimental Myriam González-Granda Gutiérrez por haber estado a mi lado siempre, apoyándome en mis decisiones y ayudándome a seguir adelante en todo momento. Me ha sido de gran ayuda todo su cariño y comprensión, con el que podido avanzar y terminar esta tesis.

No se me puede olvidar agradecer todo el apoyo mostrado por mis amigos y en especial a Juan Fernando Moya Saavedra, Sergio Villa Pérez y Javier Salguero Martín de la Sierra, con los que he compartido buenos momentos, y me han ayudado en los no tan buenos, demostrándome siempre su cariño y afecto.

Por ultimo, agradezco el apoyo a mi gato Rossi, que aunque ya no esta conmigo, siempre me ha ofrecido su cariño y su cercanía, que me ayudaron durante todo este viaje.

Y he dejado de nombrar a muchas personas que me han ayudado de una forma u otra en este trabajo, en gran parte para no extenderme en exceso. Ellos ya saben quienes son y tienen mi más sincera gratitud por todo.

RESUMEN / SUMMARY

El factor de transcripción Nurr1/NR4A2 participa en el desarrollo y el mantenimiento del fenotipo dopaminérgico de las neuronas nigroestriatales, y alteraciones en este gen han sido correlacionadas con diversas patologías como la enfermedad de Parkinson (EP). Algunas evidencias apuntan a que existe un mecanismo de regulación de Nurr1 basado en su localización subcelular. En esta tesis doctoral hemos identificado en Nurr1 una señal bipartita de localización nuclear (NLS) dentro del dominio DBD y dos señales de exporte nuclear (NES) en su dominio LBD. Los mutantes NLS no pueden entrar en el núcleo, disminuyendo la expresión del reportero de NBRE-Luc. La fusión de la señal NLS2 a la proteína EGFP indujo la acumulación nuclear de EGFP, indicando que esta secuencia es suficiente para la localización de Nurr1 en el núcleo. La mutagénesis de las señales NES provocó la acumulación de Nurr1 en el núcleo en presencia de CRM1. La fusión de las señales NES a la proteína EGFP indujeron el exporte en presencia de CRM1. El estrés oxidativo es un componente importante en diversas patologías, sin embargo, se desconoce que implicación puede tener sobre Nurr1. Mediante inmunofluorescencia e *immunoblot* se observó que Nurr1 es principalmente nuclear bajo condiciones basales. Sin embargo, Nurr1 se acumula en el citoplasma tras 30 min de tratamiento con arsenito sódico. Estos resultados nos llevaron a la conclusión de que Nurr1 posee un mecanismo de regulación asociado al control de su localización subcelular y que el estrés oxidativo cambia este equilibrio en favor de la acumulación citosólica de Nurr1. Otro componente relacionado con la EP es la quinasa GSK-3 β . Por ello quisimos estudiar si GSK-3 β participa en la pérdida de Nurr1 en el desarrollo de la EP. En esta tesis doctoral describimos que esta quinasa regula la estabilidad de Nurr1, favoreciendo su degradación proteasomal. GSK-3 β provoca el retraso de la movilidad electroforética de Nurr1 mediante fosforilación, pero no induce cambios en la localización subcelular de Nurr1. Identificamos una región candidata que denominamos “core” 2, que no responde al retraso de la movilidad electroforética, pero que no aumentó la estabilidad de Nurr1 en presencia de GSK-3 β . Así, estos resultados nos llevaron a la conclusión de que GSK-3 β favorece la degradación de Nurr1 en la fracción nuclear, de manera independiente a la región “core” 2.

The transcription factor Nurr1/NR4A2 is involved in the development and maintenance of the dopaminergic phenotype in nigrostriatal neurons, and alterations in this gene have been related with various diseases such as Parkinson's disease (PD). Some evidence suggests that there is a regulatory mechanism of Nurr1 based on their subcellular localization. In this PhD. thesis we have identified a bipartite nuclear localization signal (NLS) within the DBD domain and two nuclear export signal (NES) in the LBD domain in Nurr1. The NLS mutants cannot enter to the nucleus, decreasing the expression of NBRE3x-Luc reporter. The fusion of the NLS2 signal to EGFP induced nuclear accumulation of this protein, indicating that this sequence is sufficient for Nurr1 localization into the nucleus. The mutagenesis of NES signals induced the accumulation of Nurr1 in the nucleus in the presence of CRM1. The fusion of the NES signals to EGFP induced the export of this protein in the presence of the CRM1. Oxidative stress is an important feature in different pathologies however it is unknown its implication on Nurr1. Immunofluorescence and immunoblotting analysis showed that Nurr1 is mainly located at the nucleus under basal conditions. However, Nurr1 accumulates in the cytoplasm after 30 min treatment with sodium arsenite. These results led us to the conclusion that Nurr1 has a regulatory mechanism associated with the control of its subcellular localization and oxidative stress changes the balance in favor of the accumulation of Nurr1 at the cytoplasm. Another component related to PD is the kinase GSK-3 β . Therefore we wanted to examine whether GSK-3 β may be involve in the loss of Nurr1 in the development of PD. In this PhD. thesis we describe that this kinase regulates Nurr1 stability, promoting its degradation via proteasome. GSK-3 β is involved in the delay of the electrophoretic mobility of Nurr1 through a possible phosphorylation, but it doesn't induce changes in the subcellular localization of Nurr1. We identified a candidate region that we called "core" 2, which doesn't respond to delayed electrophoretic mobility but didn't increase the stability of Nurr1 in the presence of GSK-3 β . These results led us to conclude that GSK-3 β promotes the degradation of Nurr1 at the nucleus, independently of the region "core" 2.

ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	8
RESUMEN / SUMMARY	12
ÍNDICE	15
ABREVIATURAS	21
INTRODUCCIÓN	24
1. Aspectos generales del factor de transcripción Nurr1	25
2. Estructura de Nurr1	25
3. Distribución y función de Nurr1	27
4. Mecanismos de regulación de Nurr1	32
5. Regulación de Nurr1 por cambio de localización subcelular.....	34
6. Descripción del control del tráfico subcelular.....	35
7. Relación de la Glucógeno Sintasa Quinasa-3 β con Nurr1 en la enfermedad de Parkinson.....	38
8. Mecanismo de regulación ejercido por GSK-3 β	41
OBJETIVOS	44
MATERIALES	46
1. <u>Líneas celulares</u>	46
1.1. Células Embrionarias de Riñón Humanas (HEK) 293T.....	46
1.2. Células MN9D ratón.....	46
1.3. Células de neuroblastoma humanas SH-SY5Y.....	46
2. <u>Reactivos</u>	46
2.1. Cultivos celulares.....	46

2.2. Determinación de actividad luciferasa.....	47
2.3. Reactivos	47
2.4. Electroforesis de proteínas, transferencia e inmunodetección.	47
2.5. Fármacos y otros compuestos.....	47
2.6. Ensayo de fosfatasa λ	47
2.7. Transfecciones transitorias con fosfato cálcico.....	47
2.8. Mutagénesis dirigida.....	47
2.9. Fosforilación de oligonucleótidos.	48
2.10. Manipulación y obtención del DNA.	48
2.11. Clonaje en plásmidos.	48
2.12. Inmunofluorescencia en células.	48
 3. <u>Anticuerpos</u>	48
3.1. Anticuerpos primarios.	48
3.2. Anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano.....	49
3.3. Anticuerpos secundarios fluorescentes.	49
 4. <u>Aparatos</u>	50
 5. <u>Tampones y soluciones</u>	50
5.1. Generales.....	50
5.2. Tampones de fraccionamientos subcelulares.....	50
5.3. Tampones de lisis.....	51
 6. <u>Plásmidos</u>	52
6.1. pCIHA-CRM1.....	52
6.2. pCGN-HA-GSK-3 $\beta^{\Delta 9}$	52
6.3. pCGN-HA-GSK-3 β^{Y216F}	52

6.4. pGL3-NBRE-Luc.....	52
6.5. pGL3-TkLuc.....	53
6.6. pCMX-Nurr1.....	53
6.7. pCDNA3.1-V5His6x.....	53
6.8. pEGFP-CI.....	53
MÉTODOS.....	54
1. <u>Cultivos Celulares.</u>	54
1.1. Células Embrionarias de Riñón Humanas (HEK) 293T.	54
1.2. Células MN9D ratón.....	54
1.3. Células de neuroblastoma humanas SH-SY5Y.....	54
2. <u>Clonajes.</u>	54
2.1. Metodología.....	54
2.2. pcDNA3.1Nurr1-V5-6xHis.....	55
2.3. Deleciones de EGFPNurr1 Δ Mut-V5-6xHis.....	55
3. <u>Mutaciones.</u>	56
3.1. Metodología.....	56
3.2. pCDNA3.1Nurr1-Mut2-V5-6xHis.....	57
3.3. pCDNA3.1Nurr1-NES*-V5-6xHis.....	57
3.4. pCDNA3.1Nurr1-NLS*-V5-6xHis.....	57
3.5. pCDNA3.1Nurr1-IBOX*-V5-6xHis.....	58
4. <u>Fusión de secuencias a la proteína EGFP.</u>	58
4.1. Metodología.....	58
4.2 pEGFP-NES.....	59
4.3. pEGFP-NLS.....	59
5. <u>Inmunofluorescencia en células.</u>	59

5.1. Inmunofluorescencia.....	59
5.2. Microscopia confocal.....	60
6. <u>Métodos bioquímicos</u>	60
6.1. Determinación de la concentración de proteínas por BCA.....	60
6.2. Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas.....	60
7. <u>Transfecciones transitorias y ensayos</u>	61
7.1. Ensayo de luciferasa.....	61
7.2. Ensayo de fosfatasa λ	61
7.3. Ensayo de vida media.....	62
7.4. Ensayo de estabilidad.....	62
7.5. Ensayo de fraccionamiento subcelular.....	62
8. <u>Programas informáticos</u>	63
8.1. NesNES 1.1.....	63
8.2. NesPhos 2.0.....	63
9. <u>Análisis de datos</u>	63
9.1. Inmunoblots.....	63
9.2. Análisis estadístico.....	64
9.3. Gráficos y otros.....	64
RESULTADOS	65
<u>1. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE NURR1</u>	66
1.1. Nurr1 presenta una localización preferentemente nuclear.....	66
1.2. Identificación de dos señales de importe en Nurr1.....	68
1.3. Identificación de dos señales de exporte en Nurr1.....	72
1.4. La degradación basal de Nurr1 es independiente de su localización subcelular.....	77

1.5. El estrés oxidativo induce el exporte de Nurr1 utilizando la secuencia NES2.....	78
2. <u>REGULACIÓN DE NURR1 POR LA QUINASA GSK-3β</u>.....	83
2.1. El cloruro de litio estabiliza a Nurr1.....	83
2.2. GSK-3 β participa en la fosforilación de Nurr1.....	83
2.3. Identificación de la región de fosforilación de Nurr1 inducida por GSK-3 β	85
2.4. La fosforilación inducida por GSK-3 β no afecta a la estabilidad de Nurr1.....	90
2.5. GSK-3 β no regula la localización subcelular de Nurr1.....	92
DISCUSIÓN.....	95
1. Nurr1 es un factor de transcripción que esta regulado por cambios en la localización subcelular.....	97
2. Identificación de un posible mecanismo de regulación de Nurr1 a través de la quinasa GSK-3 β y su implicación en la enfermedad de Parkinson.....	100
CONCLUSIONES.....	104
BIBLIOGRAFÍA.....	105
ANEXOS.....	113

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-hydroxydopamine (*6-hidroxidopamina*)

AADC: L-aromatic amino acid decarboxylase (*L-aromático aminoácido descarboxilasa*)

AF1: Activation Function 1 (*Función de Activación 1*)

AF2: Activation Function 2 (*Función de Activación 2*)

ATP: Adenosine 5'-triphosphate (*adenosin-5'-trifosfato*)

BSA: Bovine Serum Albumin (*Albúmina sérica bovina*)

CAS: Cellular apoptosis susceptibility gene (*gen susceptible a apoptosis celular*)

cDNA: copy DNA (*copia DNA*)

CRM1: Chromosome Region Maintenance 1 (*región de mantenimiento cromosómica 1*)

Cys: Cysteine (*Cisteína*)

CHX: Cycloheximide (*cicloheximida*)

D: Dopamine Receptor (*Receptor de dopamina*)

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole (*diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol*)

DAT: Dopamine transporter (*Transportador de dopamina*)

DBD: DNA Binding Domain (*Dominio de unión a DNA*)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA: Deoxyribonucleic acid (*Ácido desoxirribonucleico*)

EA: *Enfermedad de Alzheimer*

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (*Ácido etilendiaminotetraacético*)

EGFP: Enhanced green fluorescent protein (*Proteína verde fluorescente mejorada*)

EGTA: Ethylene glycol tetraacetic acid (*Ácido etilen glicol tetraacético*)

EP: *Enfermedad de Parkinson*

GDP: Guanosine-5'-diphosphate (*Guanosin-5'-difosfato*)

Gpe: Globus pallidus external (*Globo pálido, porción externa*)

Gpi: Globus pallidus interna (*Globo pálido, porción interna*)

GR: Glucocorticoid Receptor (*Receptor de glucocorticoide*)

GSK-3 β : glycogen synthase kinase-3 β (*Glucógeno sintasa quinasa-3 β*)

GTP: Guanosine-5'-triphosphate (*Guanosin-5'-trifosfato*)

HA: Hemagglutinin (*Hemaglutinina*)

HamF12: Ham's Nutrient Mixtures F-12

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

HEBS: HEPES-buffered saline solution (*solución tamponante salina HEPES*)

HEK293: *Human Embryonic Kidney 293* (células de riñón embrionarias 293)

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (*Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-Pireracini]-Etanosulfónico*)

ABREVIATURAS

His: Histidine (*Histidina*)

hMD2: *human doble minute 2*

IgG: *Inmunoglobulina G*

IL-1 β : Interleukin-1 β (*Interleuquina-1 β*)

LB: Luria-Bertani

LBD: Ligand Binding domain (*Dominio de unión a ligando*)

LiCl: Lithium chloride (*Cloruro de litio*)

LPS: Lipopolysaccharide (*Lipopolisacárido*)

LRH-1: liver receptor homologue-1 (*receptor homólogo de hígado 1*)

MAPK: mitogen-activated protein kinases (*proteína quinasa activada por mitógenos*)

MCSF: Macrophage colony-stimulating factor (*factor estimulante de colonias de macrófagos*)

MEM: Minimum Essential Medium (*medio mínimo esencial*)

MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine (*1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina*)

NaCl: Sodium chloride (*cloruro sódico*)

NBRE3x-Luc: NGFI-B response element 3x-Luciferase (*Elementos de respuesta a NGFI-B 3x-Luciferasa*)

NES: Nuclear Export Signal (*señal de exporte nuclear*)

NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (*factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas*).

NGF: Nerve growth factor (*Factor de crecimiento neural*)

NGFI-B: nerve Growth factor IB (*Factor de crecimiento IB*)

NLS: Nuclear localization signal (*señal de localización nuclear*)

NO: Nitric Oxide (*óxido nítrico*)

Nrf2: NF-E2-related factor 2 (*factor 2 relacionado con NF-E2*)

NsT: subthalamic nucleus (*núcleo subtalámico*)

Nurr1: Nuclear receptor related 1 (*receptor nuclear relacionado 1*)

NurRE: Nur response element (*Elementos de respuesta a Nur*)

PARK7: parkinson protein 7 (*Proteína 7 de Parkinson*)

PBS: Phosphate buffered saline (*Tampón fosfato-salino*)

PCR: Polymerase chain reaction (*Reacción en cadena de la polimerasa*)

Phe: Phenilalanin (*Fenilalanina*)

PIAS γ : protein inhibitor of activated STAT γ (*proteína inhibidora de la actividad de STAT γ*)

PKI- α : Protein kinase A inhibitor (*Inhibidor proteína quinasa A*)

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride (*fluoruro de fenilmetilsulfonilo*)

ABREVIATURAS

POMC: Pro-opiomelanocortin (*promotor del gen pro-opiomelanocortina*)

RAR γ : Retinoic acid receptor γ (*Receptor del ácido retinoico γ*)

Redox: reduction-oxidation (*oxido-reducción*)

RIPA: *Radioimmunoprecipitation assay buffer* (Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación)

RLUs: Relative light units (*Unidades relativas de Luz*)

ROS: Reactive oxygen species (*Especies reactivas de oxígeno*)

RXR: retinoid X receptor (*Receptor X del ácido 9-cis-retinoico*)

SD: standard deviation (*Desviación estándar*)

SDS: sodium dodecyl sulfate (*Dodecil sulfato sódico*)

Ser: Serine (*Serina*)

SNC: *Sistema Nervioso Central*

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (*Polimorfismo de nucleótido simple*)

SNpc: *Substantia nigra pars compacta*

TEMED: Tetramethylethylenediamine (*N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina*)

TFIIIA: *Transcription Factor for polymerase III A* (*Factor de transcripción para la polimerasa III A*)

TH: Tyrosine hydroxylase (*Tirosina hidroxilasa*)

Thr: Threonine (*Treonina*)

TTBS: Tween-20 Tris Buffer Salt (*Tampón tris salino Tween-20*)

Tyr: Tyrosine (*Tirosina*)

V5: SV5

VMAT2: *vesicular monoamine transporter 2* (*transportador vesicular de monoaminas 2*)

Y216F: *Tyr216Phe*

INTRODUCCIÓN

1. Aspectos generales del factor de transcripción Nurr1.

Los receptores nucleares comprenden una gran variedad de factores de transcripción, como por ejemplo los receptores de esteroides, los receptores de hormonas tiroideas o los receptores de vitaminas A y D. Nurr1, también llamado NR4A2, es un miembro de esta familia de receptores y fue identificado por primera vez a partir de una librería de cDNA de cerebro de ratón en 1992 (Law *et al*, 1992). El análisis de la secuencia primaria de aminoácidos indica que este factor de transcripción posee un dominio de unión al DNA del tipo *dedos de Zinc* (CyS2-CyS2), al igual que ocurre con otros dos receptores nucleares llamados Nur77 (NGFI-B o NR4A1) y Nor-1 (NR4A3) (Saucedo-Cardenas *et al*, 1997; Wang *et al*, 2003). Estos tres factores de transcripción se engloban en una subfamilia de receptores nucleares denominados huérfanos, llamados así porque en la zona de unión a su ligando, poseen un bolsillo ocupado por aminoácidos hidrofóbicos voluminosos como son triptófano, fenilalanina y leucina, que imposibilitan la unión a un posible ligando (Jankovic *et al*, 2005, Wang *et al*, 2003). Sin embargo, recientemente se han descrito algunos agonistas sintéticos que podrían servir para regular la función de Nurr1 (Dubois *et al*, 2006). Además, estos factores de transcripción son clasificados como genes *inmediatamente tempranos* en embriogénesis, cuya expresión y actividad está regulada por diferentes estímulos que incluyen señales extracelulares mitogénicas, apoptóticas y de diferenciación (Mages *et al*, 1994; Martinez-Gonzalez and Badimon, 2005). La manipulación genética de estos receptores huérfanos ha aportado resultados limitados, ya que los ratones deficientes para Nurr1 son letales neonatos (Le *et al*, 1999; Zetterström *et al*, 1997), los nulos para Nor-1 son letales embrionarios (DeYoung *et al*, 2003) y los nulos para Nur77 presentan una apoptosis masiva de timocitos (Lee *et al*, 2007; Lee *et al*, 1995).

2. Estructura de Nurr1.

Nurr1 presenta varios dominios bien caracterizados y conservados entre los diferentes miembros de los receptores huérfanos (Fig. 1A). En el extremo N-terminal presenta un dominio variable denominado A/B, implicado en la regulación de la actividad transcripcional independiente de ligando, a través del

A

Estructura primaria de los receptores nucleares huérfanos



B

Estructura cristalográfica del “bolsillo” de unión al ligando de Nurr1

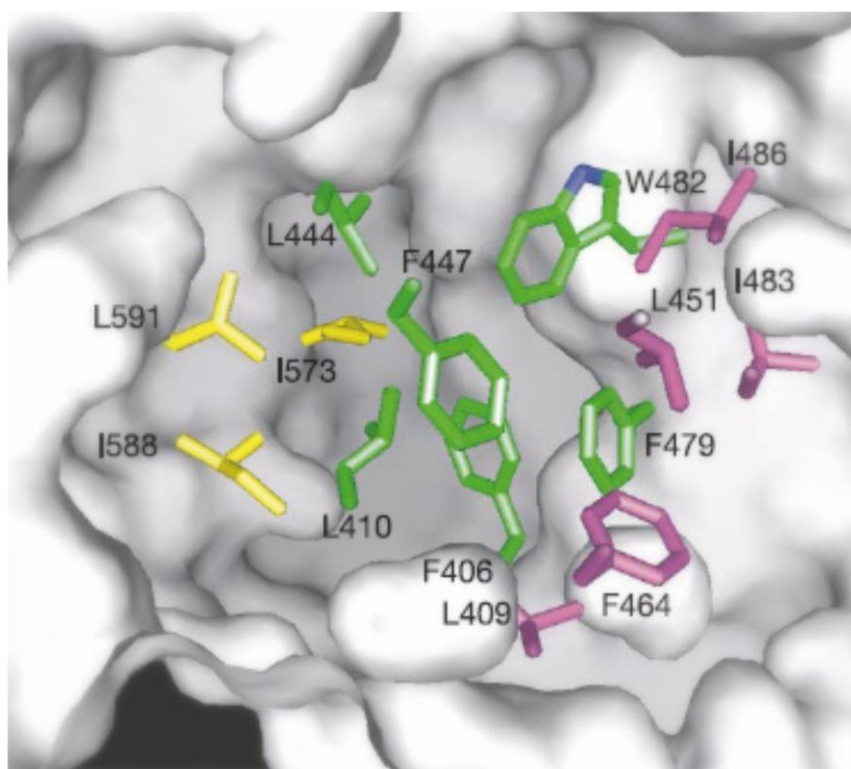


Figura 1. Esquema de la estructura de los receptores huérfanos. (A), Secuencia primaria de Nurr1, Nur77 y Nor-1 de ratón. Las tres proteínas comparten los mismos dominios, además de las dos zonas de transactivación AF1 y AF2. Se pueden distinguir tres regiones: **A/B**, implicada en la regulación de las proteínas independiente de ligando; **DBD**, implicada en la unión al DNA; **LBD**, implicada en la unión al ligando, donde se regula la unión con otros receptores nucleares para la homodimerización o heterodimerización. (B), Estructura cristalográfica de la zona de unión a ligando (LBD) de Nurr1, donde se encuentran los aminoácidos hidrofóbicos triptófano, fenilalanina y leucina (verde) que ocupan la cavidad de unión al ligando (Wang *et al*, 2003).

reclutamiento de co-activadores en una zona de transactivación llamada AF1 (*Activation Function 1*) (Maxwell and Muscat, 2006).

Le sigue un dominio DBD (dominio de unión a DNA) que le permite la unión en forma de monómero a secuencias de DNA específicas denominadas *elementos de respuesta a NGFI-B (NBRE: AAAGGTCA)*, localizadas en genes como la tirosina hidroxilasa (TH) o transportador de dopamina (DAT) (Jankovic *et al*, 2005), o bien en forma de homodímeros a secuencias de DNA palindrómicas denominadas *elementos de respuesta a Nur (NurRE: AAAT(G/A)(C/T)CA)* y presentes en el promotor del gen pro-opiomelanocortina (POMC) (Philips *et al*, 1997). Nur77 y Nur-1 también se unen a estos mismos elementos de respuesta en forma de monómeros y homodímeros. En el extremo C-terminal presenta un dominio LBD (dominio de unión a ligando) que es muy similar al dominio LBD de otro receptor nuclear llamado receptor- γ -ácido retinoico (RAR γ) (Jankovic *et al*, 2005). Dentro de esta región LBD, existe otra zona llamada AF2 (*Activation Function 2*) que es responsable de la transactivación constitutiva dependiente de ligando. En este último dominio residen dos características llamativas de la familia de receptores huérfanos que son el bloqueo de la cavidad de unión al ligando, como ilustra la Fig. 1B, y la pérdida de unión a co-activadores (Jankovic *et al*, 2005, Wang *et al*, 2003).

3. Distribución y función de Nurr1.

Nurr1 se encuentra predominantemente distribuido en el sistema nervioso central, principalmente en la *substantia nigra* y área tegmental ventral del mesencéfalo y en áreas límbicas (Jankovic *et al*, 2005; Perlmann *et al*, 2004). Es responsable de la adquisición y el mantenimiento del fenotipo dopaminérgico, y está implicado en el desarrollo, la migración y la supervivencia de las neuronas en las que se expresa. Se encarga de controlar el metabolismo de la dopamina (Fig. 2), a través de la regulación de la expresión de los genes de la tirosina hidroxilasa (TH), el transportador de dopamina (DAT), el transportador de monoaminas vesiculares 2 (VMAT2), L-aromático aminoácido descarboxilasa (AADC), etc. (Jankovic *et al*, 2005).

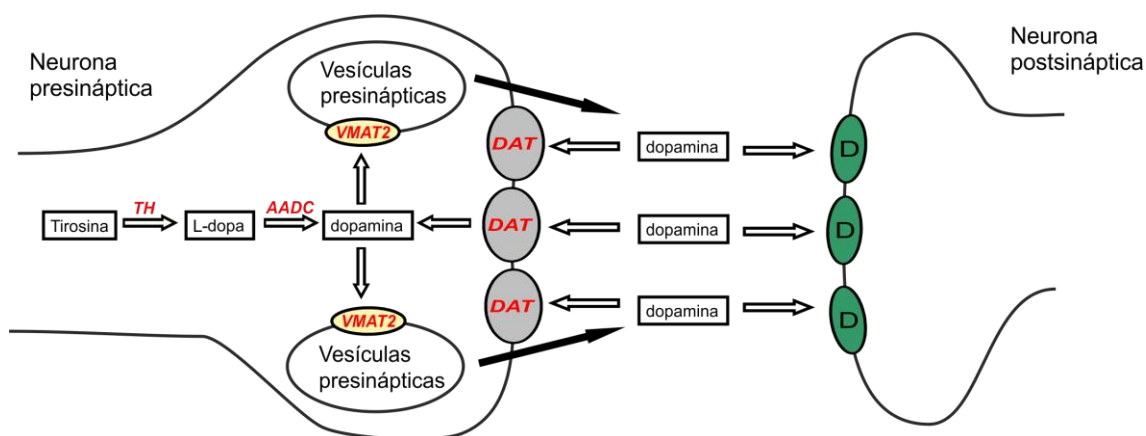
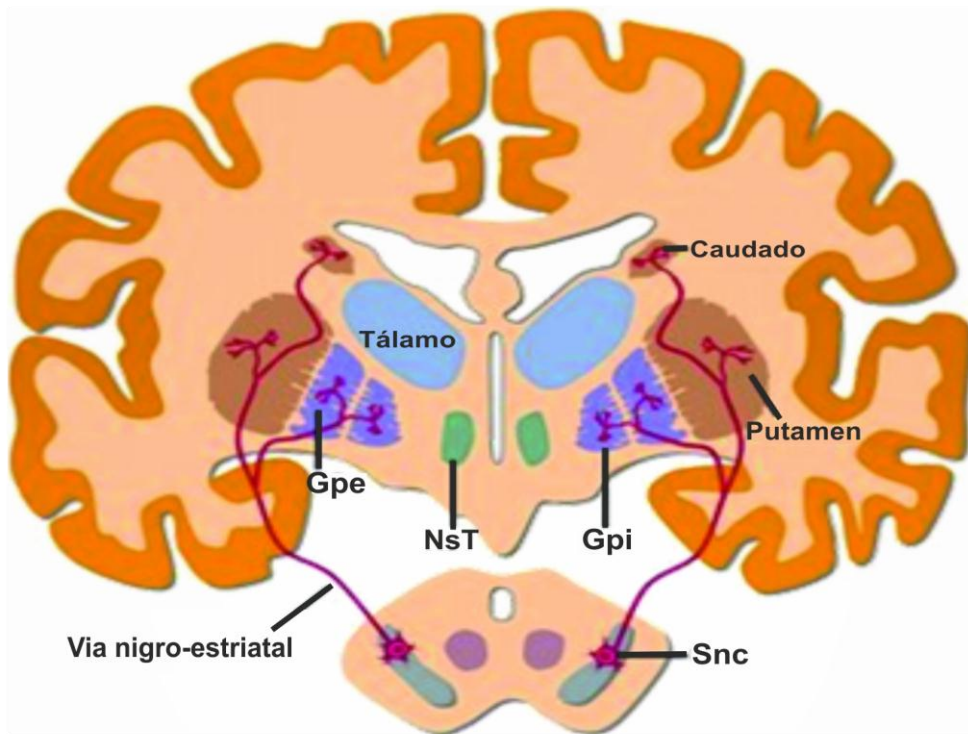


Figura 2. Papel de los genes regulados por Nurr1 en neuronas dopaminérgicas. El factor de transcripción Nurr1 induce la expresión de diferentes genes que intervienen en el metabolismo de la dopamina, entre los que se encuentran: **TH** (tirosina hidroxilasa) encargada de hidroxilar la tirosina para convertirla en L-dopa o levodopa; **AADC** (L-aromático aminoácido descarboxilasa) produce la descarboxilación de la levodopa para generar dopamina; **VMAT2** (transportador de monoaminas vesiculares 2) se encarga de transportar la dopamina a las vesículas presinápticas; **DAT** (transportador de dopamina) recapta la dopamina liberada a la hendidura sináptica. En la ilustración también se muestra el receptor de dopamina en la neurona postsináptica (**D**, círculo verde).

Algunas alteraciones en este factor de transcripción están relacionadas con la enfermedad de Parkinson (EP) (Jankovic *et al*, 2005; Le *et al*, 2008; Chu *et al*, 2006; Grimes *et al*, 2006; Jacobsen *et al*, 2008; Xu *et al*, 2002; Zheng *et al*, 2003). También ha sido vinculado con diversos desórdenes psiquiátricos como la esquizofrenia, el comportamiento maniaco y la predisposición a la adicción a la cocaína (Buervenich *et al*, 2000; Bannon *et al*, 2002).

La EP es una de las enfermedades neurodegenerativas progresivas más comunes, afectando al 1-2% de la población mayor de 65 años. Es una enfermedad predominantemente de origen tardío que se caracteriza por la aparición de temblor en reposo, rigidez muscular, bradiquinesia y pérdida de los reflejos posturales. Los pacientes también presentan síntomas psiquiátricos como depresión, ansiedad y psicosis, que culminan con la aparición de demencia (Jankovic, 2005). La principal característica patológica de la EP es la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas que contienen

A



B

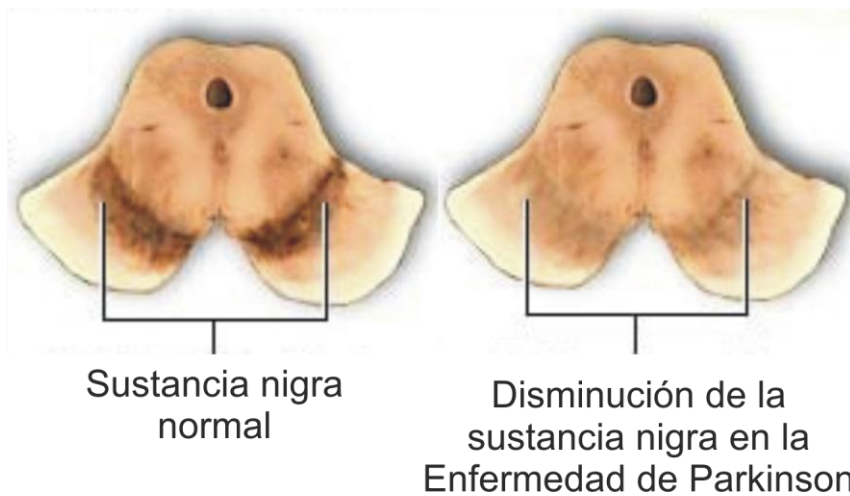


Figura 3. La EP está caracterizada por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal. (A), Representación esquemática de la localización de la vía *nigro-estriatal* en cerebro humano. Se observa como los somas de las neuronas dopaminérgicas se encuentran en la *Substantia nigra* (mesencéfalo) y proyectan sus axones sobre núcleos *caudado* y *putamen*. (B), Disminución de neuronas dopaminérgicas en la *Substantia nigra* de un individuo sano (izquierda) y de un paciente con EP (derecha). La disminución en la pigmentación se debe a la pérdida de neuronas dopaminérgicas que poseen neuromelanina.

neuromelanina de la *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) (alrededor de una pérdida de 5% por año), asociada con gliosis (Blum *et al*, 2001). Estas neuronas dopaminérgicas pertenecen a la *vía nigro-estriatal*, una vía

dopaminérgica neuronal asociada con el control motor, que se extiende desde la SNpc hasta el *caudado-putamen* (Fig. 3).

Varios estudios relacionan la pérdida de Nurr1 con la aparición y progresión de la EP de carácter esporádico o idiopático (Jankovic *et al*, 2005; Le *et al*, 2008; Chu *et al*, 2006) y demuestran que determinados polimorfismos (SNP, *single nucleotide polymorphism*) de Nurr1 (Xu *et al*, 2002; Le *et al*, 2003) o bien, mutaciones puntuales como por ejemplo Ser125Cys (Jacobsen *et al*, 2008) que anulan la actividad del factor de transcripción, predisponen al individuo a padecer la enfermedad de manera hereditaria. Alteraciones en Nurr1 no solo suponen la pérdida de la condición dopaminérgica de las neuronas, sino también de un mecanismo protector que ejerce este factor transcripcional frente a daños citotóxicos. Así, ratones heterocigotos (Nurr1^{+/-}) presentan una vulnerabilidad acrecentada frente la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP) (Le *et al*, 1999), o frente a inhibidores del proteasoma como la lactacistina (Pan *et al*, 2008).

En los últimos años se está empleando la sobre-expresión exógena de Nurr1 en células madre neurales como herramienta genética para estimular la adquisición del fenotipo dopaminérgico. Mediante estrategias de terapia celular, basadas en el trasplante de estas células, se está intentando reconstruir la función de la región lesionada en modelos animales de la EP (Li *et al*, 2007; Jo *et al*, 2009).

Dentro del sistema nervioso, la expresión de Nurr1 no solo se limita a las neuronas dopaminérgicas. Se ha descrito su expresión en células gliales como la microglia y la astrogliá, donde participa en la regulación de la respuesta inflamatoria, a través de la inhibición del factor de transcripción NF-κB (Bensinger 2009; Saijo *et al*, 2009). Como se ilustra en la Fig. 4, Nurr1 influye en los perfiles de activación de la astrogliá y la microglia, reduciendo las respuestas pro-inflamatorias y atenuando el daño neuronal causado por la inflamación crónica. La pérdida de esta regulación por formas aberrantes de Nurr1, puede constituir un mecanismo adicional en los procesos que están íntimamente relacionados con la patología de la EP.

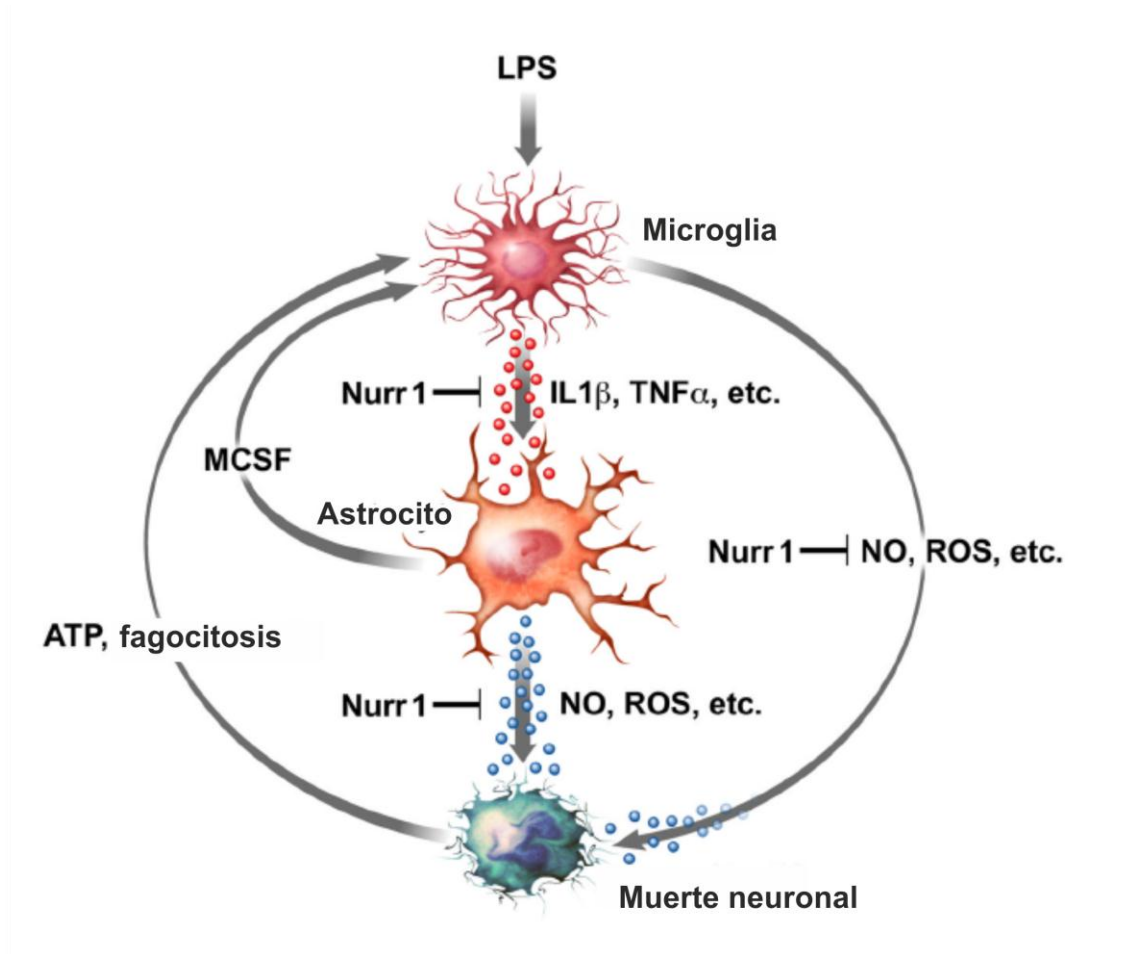


Figura 4. Mecanismo de regulación negativa de Nurr1 sobre la respuesta pro-inflamatoria de la glía. Nurr1 inhibe específicamente la producción de factores pro-inflamatorios, impidiendo la estimulación de la astroglia y de la microglia que provoca daño y muerte neuronal (Saijo *et al*, 2009).

Aunque el papel mejor conocido de Nurr1 es el que está relacionado con la EP, se ha encontrado una participación activa de Nurr1 en diversos procesos cancerosos. Por ejemplo, se ha relacionado que la activación del receptor de tromboxano A(2) induce una sobre-expresión de Nurr1 provocando la migración y la progresión tumoral en el cáncer de pulmón (Li and Tai , 2009). Además se ha observado que la localización de Nurr1 en el citoplasma correlaciona con el grado de invasividad en cáncer de vejiga (Inamoto, 2010). Asimismo la sobre-expresión de Nurr1 inducida por prostaglandina E2 participa en la proliferación celular maligna del cáncer colorrectal (Holla, 2006). Por otra parte, Nurr1 regula negativamente a p53, inhibiendo su actividad transcripcional y por lo tanto atenuando la apoptosis (Zhang *et al* 2009). Todo

ello indica que Nurr1 está jugando un papel importante en procesos tumorigénicos.

Además, se han descrito funciones relevantes de Nurr1 en la maduración de los osteoblastos por la regulación de la expresión de genes de fase tardía como la osteocalcina (Pirih *et al*, 2004), en la biosíntesis de aldosterona en la zona glomerulosa de la corteza adrenal por la regulación de la expresión de la aldosterona sintasa (Bassett *et al*, 2004) o la regulación negativa de la expresión del gen de la aromatasa en células granulosas de ovario (Wu *et al*, 2005). También, se han descrito funciones relevantes de Nurr1 y de sus parálogos Nur77 y Nor1 en el metabolismo glucolítico del hígado, en la β -oxidación y lipólisis del músculo y en la regulación de la reservas de grasa en tejido adiposo marrón y blanco (Zhao and Bruemmer 2010; Pearen and Muscat, 2010). Todo ello demuestra que aunque Nurr1 tiene un papel primordial en la adquisición del fenotipo dopaminérgico, también está implicado en multitud de otros procesos celulares que abarcan desde procesos inflamatorios hasta tumorigénesis. Por ello la regulación de este factor de transcripción puede jugar un papel decisivo en la modulación de estos procesos.

4. Mecanismos de regulación de Nurr1.

Se están empezando a conocer algunos mecanismos de regulación de Nurr1, principalmente relacionados con el control de su actividad transcripcional y su degradación (Fig. 5). La región A/B, en el extremo N-terminal, participa en la unión de Nurr1 con el receptor de glucocorticoides (Carpentier *et al*, 2008). Por tanto, se ha sugerido que al carecer de regulación por un ligando propio, Nurr1 podría utilizar los ligandos de otros receptores nucleares con los que heterodimeriza para ejercer su actividad transcripcional. Esta capacidad transcripcional también está regulada por la región que pertenece a la zona AF1, ya que mutaciones puntuales o deleciones en esta región la eliminan completamente (Nordzell *et al*, 2004). Además, la fosforilación de Nurr1 por la Ser/Thr proteína quinasa Erk1/2 en las

INTRODUCCIÓN

proximidades de la región AF1 provoca un incremento de actividad transcripcional (Sacchetti *et al*, 2006; Zhang *et al*, 2007; Jacobsen *et al*, 2008).

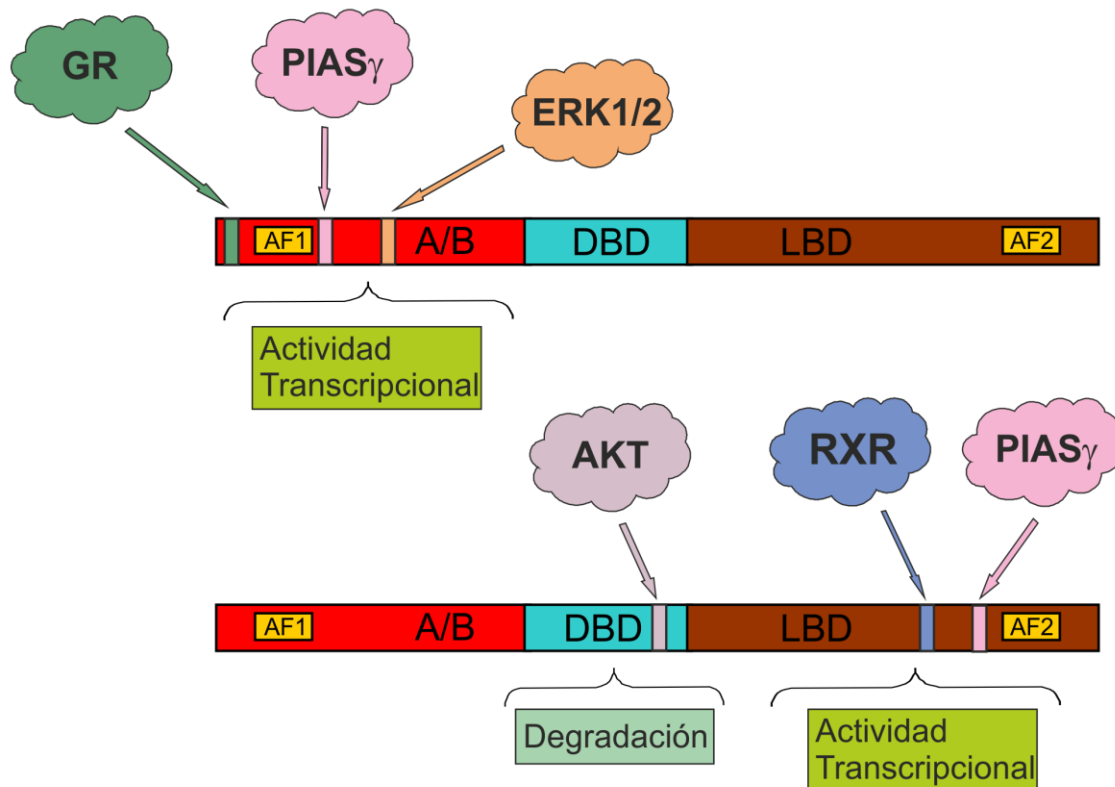


Figura 5. Mecanismos de regulación de Nurr1. La región N-terminal está sometida a regulación por fosforilación por Erk1/2, SUMOlización o heterodimerización con otros receptores nucleares. La región C-terminal también es regulada por heterodimerización con otros receptores nucleares y por SUMOlización. Por último, en la región de unión al DNA existe una diana de fosforilación por Akt que controla la estabilidad de Nurr1.

Por el contrario, la SUMOlización de esta zona reprime su actividad transcripcional (Galleguillos *et al*, 2003). Otra zona sometida a regulación es la región LBD. A través de este dominio, Nurr1 heterodimeriza por una secuencia llamada *I-BOX* con otro receptor nuclear llamado RXR (receptor X del ácido 9-*cis*-retinoico) que inhibe a Nurr1 (Aarnisalo *et al*, 2002; Sacchetti *et al*, 2002). En este caso, el receptor nuclear RXR secuestra a Nurr1 y provoca su unión a los elementos de respuesta de ácido retinoico. Dentro del dominio LBD, la región que pertenece a la zona AF2, regula la capacidad transcripcional atendiendo al tipo celular donde se exprese Nurr1 y el modo de unión al DNA, en forma de monómero o heterodímero con el receptor nuclear RXR (Castro *et al*, 1999). También en este dominio LBD se localiza una señal de SUMOlización, al igual que en la región A/B (Galleguillos *et al*, 2003), pero en

ente caso, esta modificación post-traducciona aumenta la actividad transcripcional de Nurr1. Por último, la Ser/Thr proteína quinasa Akt fosforila la región DBD y marca a Nurr1 para degradación por la vía ubiquitina proteasoma (Jo *et al*, 2009).

5. Regulación de Nurr1 por cambio de localización subcelular.

Muchos factores de transcripción están regulados a nivel de su localización subcelular. Un claro ejemplo de ello son Nrf2 (NF-E2-related factor 2) (Salazar *et al*, 2006) o Snail (Zhou *et al*, 2004), donde el cambio de localización subcelular entre núcleo y citoplasma condiciona la transcripción de sus genes diana y su estabilidad. Recientemente se ha sugerido que cambios de la localización subcelular de Nurr1 están implicados en la progresión tumoral en cáncer de vejiga (Inamoto, 2010), en mutaciones autosómicas recesivas de DJ-1 en parkinsonismo (Lu *et al*, 2012), en la regulación de la respuesta inflamatoria mediada por lipopolisacárido (LPS) (Fan *et al*, 2009) y en la excitotoxicidad provocada por glutamato en neuronas granulares cerebelares (Boldingh Debernard *et al*, 2012).

El control del tráfico subcelular de las proteínas está regulado por mecanismos que implican modificaciones post-traduccionales como fosforilación, acetilación, y SUMOización (Jans and Hübner *et al*, 1996; Du *et al*, 2008; Sasaki *et al*, 2012). Un mecanismo implicado en esta regulación es el estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un factor importante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares o cáncer entre otros, y tiene un cierto papel como regulador de la localización subcelular de diversas proteínas, como por ejemplo Nur77, otro miembro de los receptores huérfanos (No *et al*, 2010; Cao *et al*, 2004). El tratamiento con peróxido de hidrógeno en células HEK293T y con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en células dopaminérgicas SH-SY5Y, provoca la fosforilación y el transporte de Nur77 desde el núcleo hasta el citoplasma para dirigirse a la mitocondria, donde secuestra a Bcl-2 y sensibiliza frente a la apoptosis. Además, se ha observado un mecanismo de regulación alternativo del tráfico subcelular de Nur77 mediado

por NGF, que provoca el exporte del receptor RXR a través de la heterodimerización con Nur77 (Katagiri *et al*, 2000).

Por otro lado, el daño oxidativo agudo o crónico, puede inhibir significativamente el ciclo núcleo-citoplasmático, alterando a las proteínas implicadas en el transporte como la exportina CRM1 o las importinas α y β . Se ha propuesto que esta alteración puede tener gran relevancia en varias enfermedades neurodegenerativas (Patel and Chu, 2011). Por tanto, uno de los objetivos de esta tesis doctoral será el estudio del estrés oxidativo como un nuevo mecanismo de regulación de Nurr1, basado en el control del tráfico subcelular.

6. Descripción del control del tráfico subcelular.

El control de la localización subcelular surge como consecuencia de la adquisición de un sistema de endomembranas característico de las células eucariotas, más concretamente, la envuelta nuclear. Esto obliga a una regulación del intercambio desde el citoplasma al núcleo o viceversa de estas proteínas, mediante el uso de señales de localización nuclear o NLS (*nuclear localization signal*) o señales de exporte nuclear o NES (*nuclear export signal*) (Moroianu J. 1999). Ambas señales de localización subcelular mantienen un patrón común y unas características que se encuentran conservadas en todas las señales de importe y exporte. Las proteínas pequeñas (< 50 kDa) son capaces de pasar a través del complejo de poro nuclear mediante difusión pasiva y carecen de este tipo de señales. Por otro lado, proteínas con tamaños mayores (>50 kDa), es necesaria la ayuda de una familia de proteínas denominadas carioferinas que reconocen estas señales y facilitan el transporte por los poros nucleares (Sorokin *et al*, 2007). Estas carioferinas pueden actuar como importinas (reconocen y se unen a secuencias NLS) que transportan las proteínas al núcleo (Lange 2007) o exportinas (reconocen y se unen a secuencias NES) que transportan las proteínas al citoplasma (Kutay, 2005), compartiendo en su totalidad una estructura tridimensional similar. Algunas de estas carioferinas tienen simplemente una función de “*scaffold*” (andamiaje), como por ejemplo la α -importina, sirviendo como puente para otras. Este

mecanismo necesita de un componente adicional que ayude a llevar a cabo el tráfico subcelular, como son las GTPasas monoméricas Ran que aportan el componente energético en forma de intercambio de formas de GDP/GTP.

Como se ilustra en la Fig. 6, el esquema clásico para la importación de partículas con señal de localización nuclear comienza primero con la α -importina uniéndose a la secuencia NLS de la proteína cargo. Esta NLS está formada por grupos de aminoácidos básicos como lisinas y argininas, pudiendo estar constituidos por uno o dos “clusters” denominándose señales monopartitas, bipartitas o incluso tripartitas. La α -importina actúa como un puente para unir la β -importina y formar el complejo cargo/ β -importina/ α -importina que dirigirá su cargo hacia el poro nuclear y difundirá a través de él. Una vez que el complejo está en el núcleo, RanGTP se une a la β -importina y la desplaza del complejo. Luego una exportina llamada CAS (*cellular apoptosis susceptibility gene*), se une a RanGTP en el núcleo y separa a la α -importina de su carga. De esta manera, la proteína transportada se encuentra libre en el núcleo. Los complejos β -importina-RanGTP y α -importina-CAS-RanGTP difunden de vuelta hacia el citoplasma donde los GTPs son hidrolizados a GDP llevando a la liberación de β -importina y α -importina que vuelve a estar disponible para una nueva importación de proteínas de señal de localización nuclear. El ciclo de importación funciona gracias al gradiente de RanGTP núcleo-citoplasmático. Este gradiente surge de la localización nuclear exclusiva de RanGEFs, proteínas que cambian GDP a GTP en moléculas Ran. Por lo tanto hay una concentración elevada de RanGTP en el núcleo comparada con el citoplasma (Sorokin *et al*, 2007).

Importe

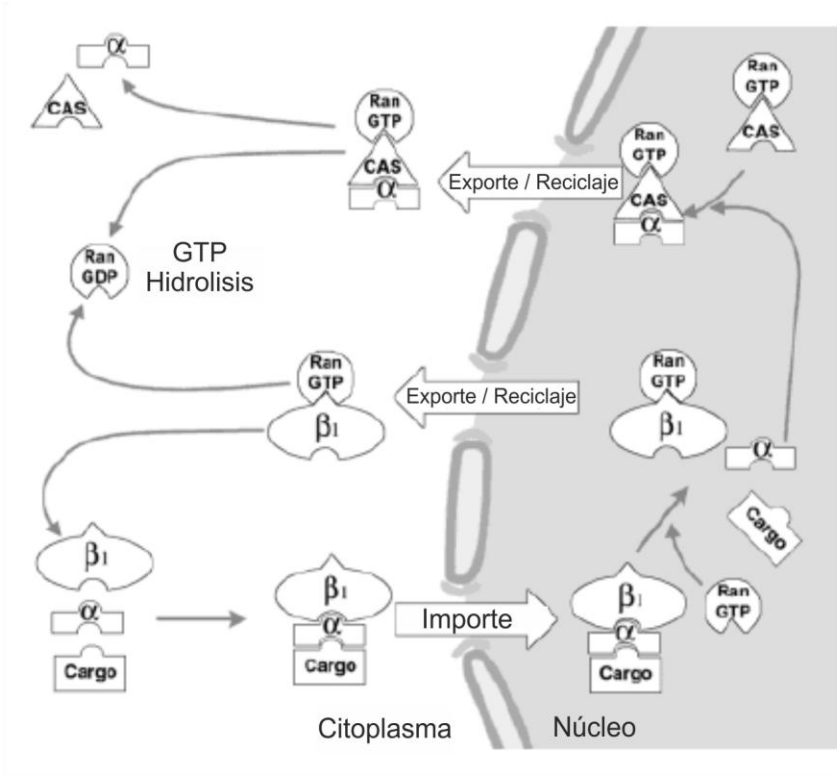


Figura 6. Mecanismo de importe y reciclaje de las importinas α y β . La proteína cargo es inicialmente reconocida por la α -importina, que sirve como puente para el acoplamiento de la β -importina. Este heterotrímero, es transportado a través del poro nuclear, al interior del núcleo. Un vez allí, la proteína cargo es liberada mediante el desacoplamiento de la β -importina por RanGTP y la separación de α -importina por el dímero CAS-RanGTP. Los complejos β -importina-RanGTP e α -importina-CAS-RanGTP difunden de vuelta hacia el citoplasma donde los GTPs son hidrolizados a GDP llevando a la liberación de β -importina y α -importina que vuelve a estar disponible para un nuevo ciclo de transporte (Moroianu, 1999).

En el esquema clásico de exporte, las proteínas cargo poseen secuencias de exporte nuclear (NES), que están formadas por grupos de aminoácidos hidrofóbicos alifáticos, principalmente leucinas, aunque pueden también existir isoleucinas o fenilalaninas, y su número varía dentro de una misma proteína, pudiendo existir una única secuencia o más. Como ilustra la Fig. 7, estas proteínas se unen en el núcleo para formar un complejo heterotrimérico con exportinas como por ejemplo CRM1 (Chromosome Region Maintenance, también denominado Exportin 1 o XPO1) (Kosugi *et al*, 2008), que reconocen estas señales NES y RanGTP. El complejo puede difundir al citoplasma donde el GTP es hidrolizado y la proteína de secuencia de exportación nuclear es liberada (Sorokin *et al*, 2007)

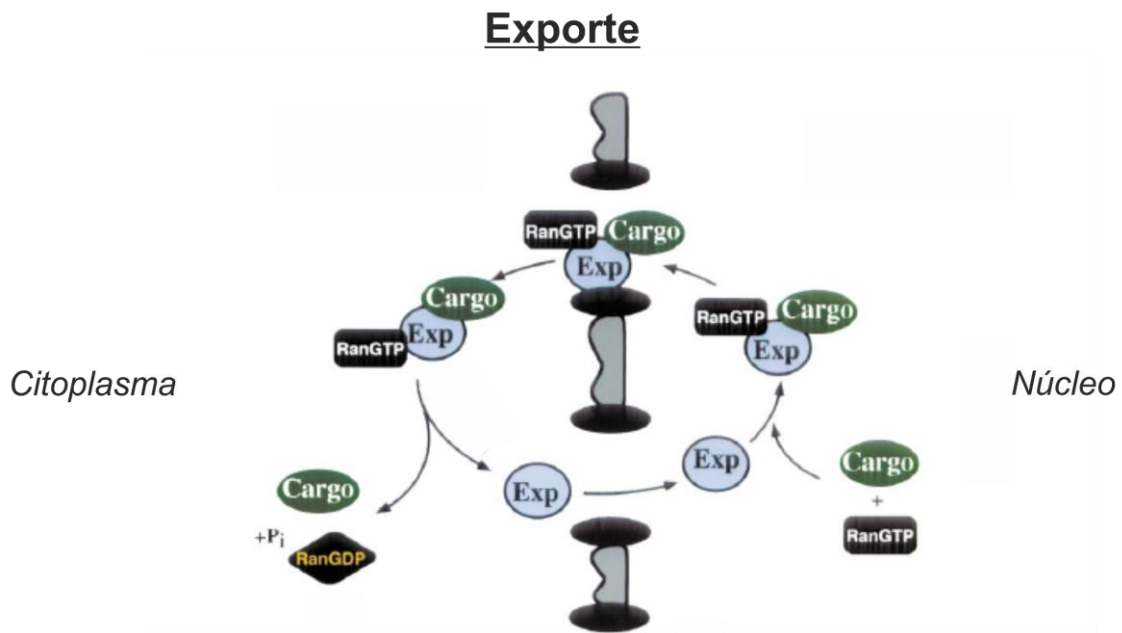


Figura 7. Mecanismo de exporte de proteínas nucleares. Para el exporte de proteínas a través del poro nuclear al citoplasma, existen carioferinas denominadas exportinas (por ejemplo la exportina CRM1) que forman un complejo con el cargo y con la GTPasa RanGTP. La hidrólisis del RanGTP a RanGDP libera al cargo de la exportina al citoplasma. A continuación, el dímero CRM1-RanGDP difunde de nuevo al interior del núcleo, donde el GDP es intercambiado por GTP por la RanGEF.

En esta tesis doctoral analizaremos cómo estos mecanismos de tránsito subcelular afectan al factor de transcripción Nurr1.

7. Relación de la Glucógeno Sintasa Quinasa-3 β con Nurr1 en la enfermedad de Parkinson.

Otro factor implicado de la EP es la quinasa GSK-3 β (Glucógeno sintasa quinasa-3 β). Esta Ser/Thr proteína quinasa, descubierta en 1980, se caracterizó inicialmente por regular el metabolismo del glucógeno ya que fosforila e inhibe a la glucógeno sintasa (Cohen *et al*, 2001). También participa en diversas patologías como, por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer (EA) (Hsiung *et al*, 2003), osteoporosis (Smith and Frenkel, 2005), aterosclerosis (Robertson *et al*, 2006), cáncer (Inoki *et al*, 2006) e hipertrofia cardíaca (Morisco *et al*, 2001). Recientemente se ha implicado a GSK-3 β en la EP (Nagao *et al*, 2009).

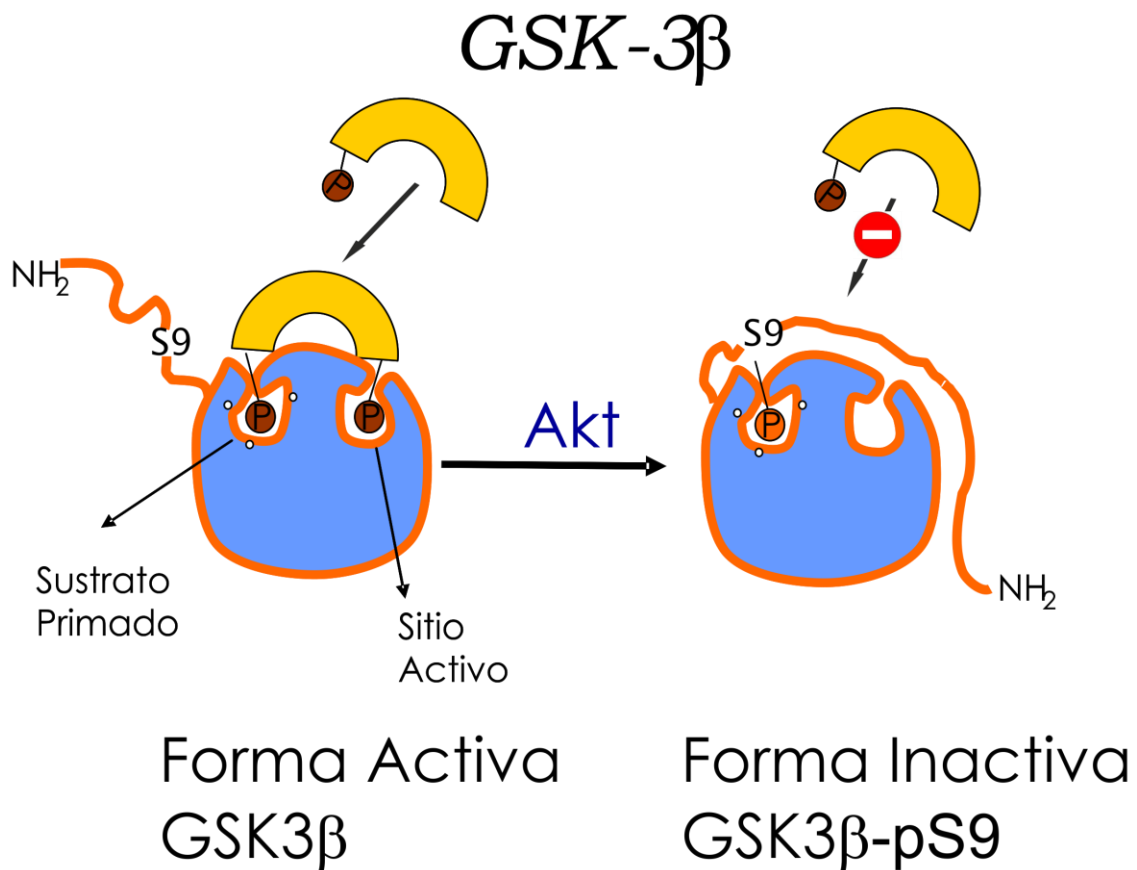


Figura 8. Regulación de GSK-3 β por la quinasa Akt. GSK-3 β es una quinasa que fosforila sustratos primados (el sustrato se encuentra previamente fosforilado por otra quinasa diferente). El extremo N-Terminal es una cadena polipeptídica que funciona como pseudo-sustrato de GSK-3 β y es objeto de regulación por parte de la quinasa AKT. Cuando AKT fosforila el pseudo-sustrato de GSK-3 β en la serina-9, esta ocupa el dominio que reconoce el sustrato primado, impidiendo la fosforilación de GSK-3 β . Esta forma inactiva de GSK-3 β se la conoce como GSK-3 β -pS9.

La Fig. 8 ilustra la regulación mejor conocida de GSK-3 β , que es la fosforilación e inhibición por Akt (Cross *et al.*, 1995). Se ha observado la presencia de formas activas e inactivas (GSK-3 β -pS9) de GSK-3 β en la periferia de los cuerpos de Lewy (Nagao *et al.*, 2009). Estos cuerpos de Lewy son inclusiones citoplasmáticas, que están presentes en las neuronas dopaminérgicas alteradas, implicadas de la EP. Están formados principalmente por α -sinucleína (Takeda *et al.*, 1998), y por otros componentes que se encuentran en menor proporción como ubiquitina, lípidos (Gai *et al.*, 2000) o la sinfilina-1 (Wakabayashi *et al.*, 2000). La posible participación de GSK-3 β en la EP se refleja también en que inhibidores de esta quinasa provocan la disminución de la expresión de α -sinucleína (Kozikowski *et al.*,

2006) y la fosforilación de sinfilina-1 (Avraham *et al*, 2005), eventos que favorecen la formación de éstos cuerpos de Lewy. Además, existe una asociación entre riesgo de contraer EP y polimorfismos en el gen que codifica GSK-3 β (Kwok *et al*, 2005). El SNP rs334558 provoca un incremento de la expresión de la quinasa y el rs6438552 provoca una alteración en el *splicing* del mensajero entre los exones 9-11, generando un aumento de la actividad quinasa. Las neurotoxinas parkinsonianas 6-OHDA y MPTP inducen estrés oxidativo, y alteran la homeostasis redox de las neuronas dopaminérgicas, provocando un incremento de la actividad de GSK-3 β (Wang *et al*, 2007; Chen, 2004; Yeste *et al*, 2007). Es importante resaltar que el efecto de la neurotoxina 6-OHDA solamente ha sido observada en experimentos *in vitro*, utilizando células en cultivo (Chen, 2004; Yong *et al*, 2011). Por el contrario, el efecto del MPTP en la activación de GSK-3 β es reproducible tanto en experimentos *in vitro* (Yeste *et al*, 2007), como en *in vivo* (Wang *et al*, 2007). Utilizando el MPTP como modelo de neurotoxicidad para inducir en animales el cuadro lesivo característico de la EP, se aprecian dos efectos importantes: el aumento de la actividad GSK-3 β , reflejada como la caída de la forma fosforilada inactiva GSK3 β -pS9, y la pérdida de marcadores dopaminérgicos como la tiroxina hidroxilasa (Fig.9) (Wang *et al*, 2007). Como se ha descrito anteriormente, la vulnerabilidad que presentan los ratones Nurr1^{+/-} a MPTP, y la asociación genética entre SNPs de GSK-3 β y riesgo de EP sugieren la participación de esta quinasa en la modulación de fenotipo dopaminérgico a nivel de Nurr1, provocando una disminución de este factor y de sus dianas como tiroxina hidroxilasa.

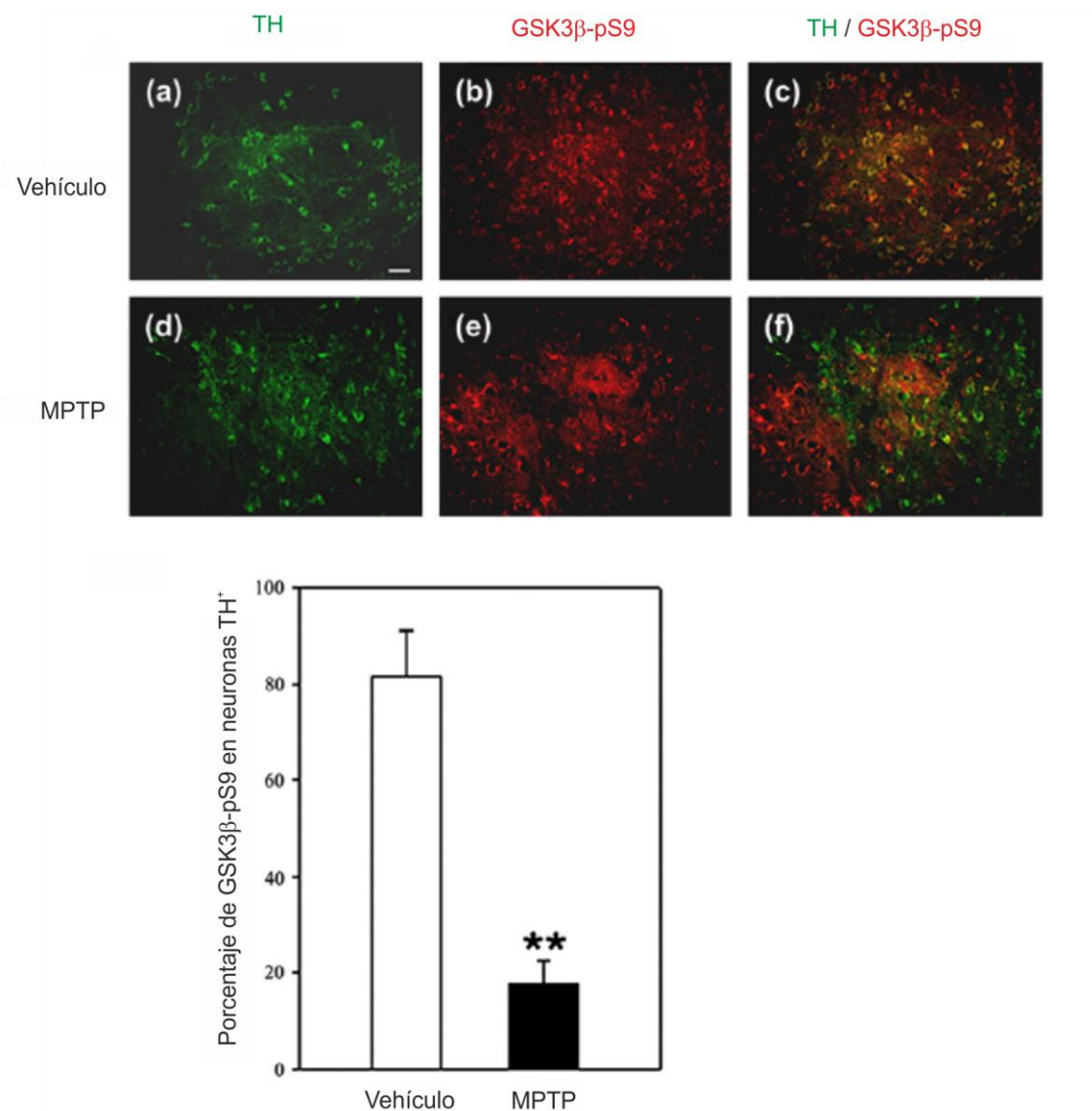


Figura 9. La activación GSK-3 β provoca una mayor pérdida de neuronas dopaminérgicas frente al tratamiento con MPTP. Se observa que el MPTP mata selectivamente a aquellas neuronas que expresan TH y a su vez poseen forma activa de GSK-3 β , ya que el porcentaje de co-localización de neuronas TH⁺ y GSK3 β -pS9⁺ disminuye respecto al control (Wang *et al*, 2007).

8. Mecanismo de regulación ejercido por GSK-3 β .

GSK-3 β se caracteriza por inhibir la actividad de sus sustratos. Por ejemplo, la glucógeno sintasa que regula el metabolismo del glucógeno es inhibida mediante fosforilación (Cohen *et al*, 2001); en el caso de la β -catenina, que participa en desarrollo y supervivencia celular, la fosforilación por GSK-3 β regula su estabilidad y su importe al núcleo (Rayasam *et al*, 2009); la fosforilación de la proteína Tau inhibe su unión a microtúbulos alterando el

INTRODUCCIÓN

ensamblaje y la polimerización, además de estar muy relacionada con la EA (Liu *et al*, 2002). Por otro lado, esta quinasa inhibe algunos factores de transcripción. Al fosforilar estos factores, GSK-3 β aumenta su afinidad por la exportina CRM1, que induce su salida al citoplasma. Una vez allí, el sustrato es reconocido por sistemas de ubiquitina E3-ligasas que poli-ubiquitinan proteínas fosforiladas para luego ser degradadas a través de la vía del proteasoma (Fig. 10). Algunas de estas proteínas reguladas según este mecanismo son Snail (Zhou *et al*, 2004) o Nrf2 (Salazar *et al*, 2006; Rada *et al*, 2011). En esta tesis doctoral analizaremos si Nurr1 podría estar regulado por GSK-3 β de manera similar.

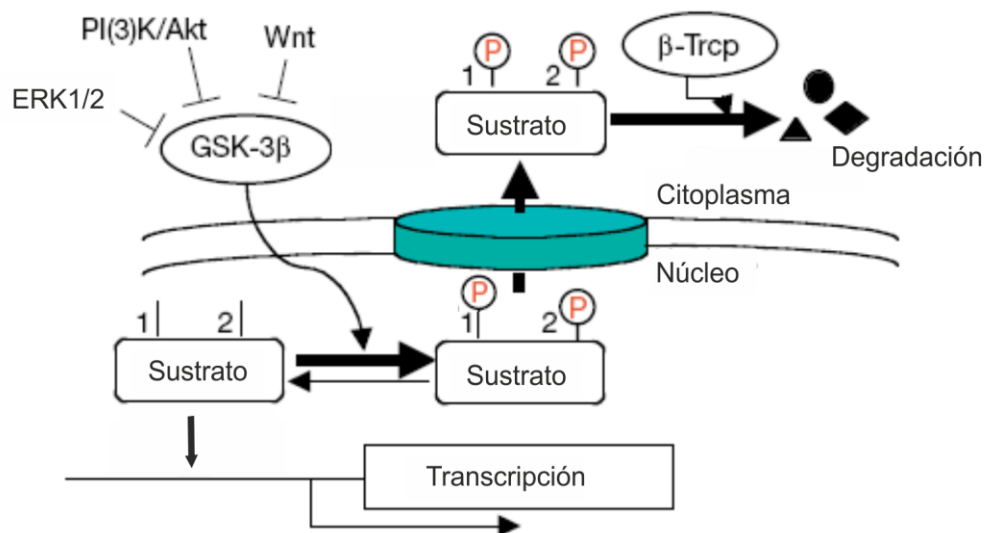


Figura 10. Regulación por GSK-3 β de algunos sustratos conocidos como Snail o Nrf2. Se observa que GSK-3 β es un integrador de varias rutas confluentes que inhiben a la quinasa, como son Wnt, Akt y Erk1/2. Por otro lado, GSK-3 β regula negativamente a estos factores de transcripción a dos niveles: 1) GSK-3 β los marca mediante fosforilación para su salida del núcleo mediante la exportina CRM1; 2) la fosforilación sirve de señal de reconocimiento para la E3-ligasa β -TrCP que lo envía a degradación por la vía ubiquitina- proteasoma.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos planteados en esta Tesis doctoral son los siguientes:

1. Estudio de una nueva forma de regulación de Nurr1 basada en el control de su localización subcelular.

- 1.1** Análisis de la distribución celular de Nurr1 en diferentes modelos celulares.
- 1.2** Búsqueda y caracterización de señales de localización nuclear (NLS) en la secuencia primaria de Nurr1.
- 1.3** Búsqueda y caracterización de señales de exporte nucleares (NES) en la secuencia primaria de Nurr1.
- 1.4** Análisis de la estabilidad de Nurr1 por cambios en su localización subcelular.
- 1.5** Caracterización del estímulo oxidativo como inductor del exporte de Nurr1 desde el núcleo hasta el citoplasma.

2. Estudio de la implicación de la quinasa GSK-3 β en la regulación de Nurr1.

- 2.1** Análisis de la estabilidad de Nurr1 en presencia de inhibidores de la quinasa GSK-3 β .
- 2.2** Identificación de modificaciones post-traduccionales por fosforilación en presencia de GSK-3 β .
- 2.3** Búsqueda y caracterización de la región de fosforilación en Nurr1 mediada por GSK-3 β .
- 2.4** Búsqueda de la función que otorga la fosforilación en Nurr1 inducida por GSK-3 β .

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Líneas celulares.

1.1. Células Embrionarias de Riñón Humanas (HEK) 293T.

Son células que provienen de riñón embrionario humano, que posteriormente fueron immortalizadas con adenovirus. Se les incorpora el *antígeno T grande* procedente del poliomavirus SV40 que permite aumentar la replica episómica de los plásmidos transfectados (Graham *et al*, 1977).

1.2. Células MN9D ratón.

Son células dopaminérgicas immortalizadas procedentes de una fusión de células embrionarias del tegmento mesencefálico rostral con células de neuroblastoma N18TG2 (Choi *et al*, 1991).

1.3. Células de neuroblastoma humanas SH-SY5Y.

Son células humanas que derivan de una línea celular de neuroblastoma, obteniéndose a partir de tres subclones procedente de SK-N-SH. El clonaje es una selección artificial de un grupo de células que expresan un fenotipo dopaminérgico. Es una línea establecida con marcadores dopaminérgicos (Biedler *et al*, 1978).

2. Reactivos.

2.1. Cultivos celulares.

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), DMEM alta glucosa, PBS (*Phosphate Buffered Saline*), MEM (*Minimum Essential Medium*) y HamF12 (*Ham's Nutrient Mixtures F-12*) fueron preparados por el Servicio de Medios de Cultivo del Instituto de Investigaciones Biomédicas; HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) (Invitrogen); suero fetal bovino y tripsina (Invitrogen); gentamicina (Genta Gobens); material plástico (Nunc, Falcon y Starsted).

2.2. Determinación de actividad luciferasa.

Luciferase Assay System (Promega).

2.3. Reactivos.

Cloruro sódico, fluoruro sódico, pirofosfato sódico, ortovanadato sódico, Nonidet NP-40, glicerol, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), deoxicolato sódico, EGTA, leupeptina (Sigma-Aldrich). EDTA, HEPES (proporcionado por el Servicio de Medios De Cultivo del Instituto de Investigaciones Biomédicas). Dodecil sulfato sódico (SDS) y Cloruro potásico (Merck).

2.4. Electroforesis de proteínas, transferencia e inmunodetección.

Marcadores de peso molecular *Bench Protein Ladder* (Invitrogen) y *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad). Acrilamida, bisacrilamida, Tween-20, D_c *Protein Assay* (Bio-Rad), membranas Immobilon-P (Millipore), ECL (GE Healthcare), BSA (*Bovine serum albumin*), azul de bromofenol, glicerol, glicina, TEMED, persulfato amónico, Trizma Base (Sigma-Aldrich), metanol, SDS, EDTA (Merck).

2.5. Fármacos y otros compuestos.

Arsenito sódico y MG132 (Sigma-Aldrich); Cloruro de litio (Merk), Cicloheximida (Boehringer Mannheim).

2.6. Ensayo de fosfatasa λ .

Fosfasa λ (Upstate, Millipore).

2.7. Transfecciones transitorias con fosfato cálcico.

Hepes (Gibco), Cloruro de calcio (Sigma-Aldrich), HEBS 2x (NaCl, HEPES, Na₂HPO₄; Sigma-Aldrich).

2.8. Mutagénesis dirigida.

Gene Tailor Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen)

2.9. Fosforilación de oligonucleótidos.

Polinucleótido quinasa T4 (Promega).

2.10. Manipulación y obtención del DNA.

Antibióticos: ampicilina y kanamicina (Sigma-Aldrich). Electroforesis en geles de agarosa (Biotools), SybrSafe (Invitrogen). Marcadores de peso molecular DNA λ HindIII (Invitrogen). Extracción de DNA plasmídico en bacterias con “MaxiPrep” (Roche).

2.11. Clonaje en plásmidos.

PCR (GC-Rich PCR System, Roche), Phosphatase alkaline AP (Roche), GeneClean (MP Biomedicals, LLC), Enzimas de restricción (Invitrogen, New England Biolabs). Agarosa bajo punto de fusión (NuSieve GTG Agarose, Berlabo), T4 DNA Ligasa, Kit Miniprep (Promega). Bacterias competentes *E.coli* DH5 α , fueron preparados por el Servicio de Medios de Cultivo del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

2.12. Inmunofluorescencia en células.

Para-formaldehído, Nonidet NP-40, diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol o DAPI (Sigma-Aldrich).

3. *Anticuerpos.*

3.1. Anticuerpos primarios.

- anti-V5 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Anticuerpo monoclonal de ratón que permite reconocer en proteínas recombinantes el epítipo V5. Este epítipo se encuentra en las proteínas *P* y *V* del virus *paramyxovirus* SV5.

- anti-HA (Abcam). Anticuerpo policlonal de conejo que permite reconocer en proteínas recombinantes el epítipo HA. Este epítipo pertenece a un fragmento de la proteína hemaglutinina del virus *orthomyxovirus*.
- anti-Nurr1 (Chemicon). Anticuerpo policlonal de conejo que permite reconocer a la proteína Nurr1, uniéndose al dominio de unión de DNA (Dedos de Zinc). Reactivo contra humano y roedores.
- anti- β -actina (Santa Cruz Biotechnology, INC). Anticuerpo policlonal de cabra que reconoce el extremo C-terminal de β -actina humana. Reactivo contra humano, roedores, pez-cebra, *C. elegans*, *Drosophila*, *S. cerevisiae* y *Xenopus*.
- anti-lámina B (Santa Cruz Biotechnology, INC). Anticuerpo policlonal de cabra que reconoce la lámina B1 y en menor medida la lámina B2 y B3. Reactivo contra humano y roedores.
- anti-EGFP (Sigma-Aldrich). Anticuerpo policlonal de conejo que reconoce el extremo N-terminal de la proteína verde fluorescente.

3.2. Anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano.

- anti-ratón IgG Peroxidasa (GE Healthcare, UK).
- anti-conejo IgG Peroxidasa (GE Healthcare, UK).
- anti-cabra IgG Peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, INC)

3.3. Anticuerpos secundarios fluorescentes.

- anti-ratón IgG conjugado Alexa Fluor 488 cabra (Molecular Probes)
- anti-conejo IgG conjugado Alexa Fluor 546 de cabra (Molecular Probes)

4. Aparatos.

- Luminómetro GLOMAX 96 (Promega)
- Leica DMIRE2TCS SP5 confocal (Nussloch, Alemania)
- CHEMIBIS (DNR). Aparato utilizado para revelar *immunoblot*, capturando la quimioluminiscencia producida por la peroxidada cuando se le añade el sustrato y visualizándola de forma digital en un programa informático.
- *Benchmark Microplate Reader* (BioRad). Lector de placas de 96 pocillos, utilizado para espectroscopia.

5. Tampones y soluciones.

5.1. Generales

Medio LB (Luria-Bertani) para cultivos bacterianos: (triptona, extracto de levadura, cloruro sódico). Tampón PBS (tampón fosfato-salino) como solución fisiológica: (cloruro sódico 8.0 g/l, fosfato sódico 1.15 g/l, cloruro de potasio 0.2 g/l y fosfato de potasio 0.2 g/l). Tampon Tris-HCl 1 M pH 7.5, pH 8.8 y pH 6.8, HEPES 1 M pH 7.5, SDS 10%, EDTA 0.5 M pH 8.0 fueron proporcionado por el fueron preparados por el Servicio de Medios de Cultivo del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

5.2. Tampones de fraccionamientos subcelulares:

- Tampón A:

(20 mM HEPES, pH 7.0, 0.15 mM EDTA, 0.015 mM EGTA, 10 mM Cloruro potásico, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 20 mM fluoruro sódico, 1 mM pirofosfato sódico, 1 mM ortovanadato sódico, 1% Nonidet P-40, 1 µg/ml leupeptina).

- Tampón B:

(10 mM HEPES, pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 20 mM fluoruro sódico, 1 mM pirofosfato sódico, 1 mM ortovanadato sódico, 25% glicerol, 0.1 M cloruro sódico, 1 µg/ml leupeptina).

- Tampón C:

(10 mM HEPES, pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 20 mM fluoruro sódico, 1 mM pirofosfato sódico, 1 mM ortovanadato sódico, 25% glicerol, 0.4 M cloruro sódico, 1 µg/ml leupeptina).

5.3. Tampones de lisis:

- Tampón RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer):

(150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1 mM fluoruro sódico, 1 mM pirofosfato sódico, 1 mM ortovanadato sódico, 1% Nonidet P-40, 1 µg/ml leupeptina, 1mM EGTA, 1% deoxicolato sódico, 0,1% dodecil sulfato sódico (SDS)).

- Tampón AKT sin inhibidores de fosfatasas:

(137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Nonidet P-40, 10% glicerol, 1 µg/ml leupeptina, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo).

- Tampón de carga para geles de electroforesis SDS-PAGE:

50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 150 mM β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich).

- Tampón TTBS:

50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM cloruro sódico, 0.1% Tween-20.

- Tampón de carga de DNA:

Para fragmentos con más de 500 pb empleamos: 1% azul de bromofenol, 30% glicerol en tampón Tris-acetato-EDTA pH 7.5. Preparado según indica en el manual de Sambrook *et al*, 1989.

6. Plásmidos.

6.1. pCIHA-CRM1:

Vector que expresa la exportina 1 o CRM1. Fue cedido por el Dr. Alan Diehl (*Leonard and Madlyn Abramson Family Cancer Research Institute and Cancer Center, Department of Cancer Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia*).

6.2. pCGN-HA-GSK-3 $\beta^{\Delta 9}$:

Vector que expresa la forma humana dominante positiva de GSK-3 β por delección de la serina-9. Fue cedido por el Dr. Akira Kikuchi (Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Hiroshima University).

6.3. pCGN-HA-GSK-3 β^{Y216F} :

Vector que expresa la forma humana dominante negativa GSK-3 β por introducción de una mutación puntual en la tirosina-216 por una fenilalanina. Fue cedido por el Dr. Akira Kikuchi (Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Hiroshima University).

6.4. pGL3-NBRE-Luc:

Vector que contiene 3 secuencias en tándem de los elementos de respuesta a Nurr1 (NBRE), unido al gen de la luciferasa de luciérnaga. Fue cedido por el Dr. Philippe Lefebvre (*INSERM U545, Lille; Institut Pasteur de Lille, Département d'Atherosclérose, 59019 Lille, France*).

6.5. pGL3-TkLuc:

Vector utilizado de relleno para los ensayo de luciferasa. Fue cedido por el Dr. Philippe Lefebvre (*INSERM U545, Lille; Institut Pasteur de Lille, Département d'Atherosclérose, 59019 Lille, France*).

6.6. pCMX-Nurr1:

Vector que expresa la proteína Nurr1 de ratón. Utilizado como molde para la construcción del vector pCDNA3.1-Nurr1-V5His6x. Fue cedido por el Dr. Kazuhiko Umesono (*Dept. Molecular Biology and Genetic, Institute for Virus Research, Kyoto University*)

6.7. pCDNA3.1-V5His6x:

Vector utilizado para crear proteínas de fusión, etiquetadas en el extremo C-terminal de las proteínas con el epítipo V5 y una cola de seis histidinas.

6.8. pEGFP-C1:

Vector que expresa la proteína verde fluorescente, que ha sido utilizado como control para ensayos de inmunofluorescencia y como vector para crear proteínas de fusión en el extremo N-terminal con GFP.

MÉTODOS

1. Cultivos Celulares.

1.1. Células Embrionarias de Riñón Humanas (HEK) 293T.

Las células fueron crecidas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 80 mg/ml de gentamicina.

1.2. Células MN9D de ratón.

Las células fueron crecidas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium rico en glucosa (DMEM Sigma-Aldrich), suplementado con 10% de suero fetal bovino y 80 mg/ml gentamicina.

1.3. Células de neuroblastoma humanas SH-SY5Y.

Las células fueron crecidas en medio 1:1 de *Minimum Essential Medium* y *Ham's Nutrient Mixtures F-12* suplementado con 10% de suero fetal bovino y 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de streptomycin.

2. Clonajes

2.1. Metodología:

Para crear los plásmidos pcDNA3.1Nurr1-V5-6xHis y las diferentes delecciones de pEGFPNurr1ΔMut-V5-6xHis realizamos PCR sobre 100 ng de los moldes apropiados para generar y amplificar los insertos con 2 U de *GC-Rich PCR System* y una mezcla de 2 mM de *primers* sintéticos específicos en un volumen de reacción final de 50 µl. La reacción de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 95 °C y posteriormente 20 ciclos: 30 s a 95 °C (desnaturalización), 30 s a 55 °C (anillamiento) y 8 min a 68 °C (polimerización). Por ultimo, una extensión final de 7 min a 72 °C. El producto se chequeó en geles de agarosa 1% y se procedió a su digestión con las enzimas apropiadas para introducirlo en el vector. Para ello, se utilizarón 10 U

de cada enzima para la digestión de los insertos amplificados por PCR y para la digestión de 5 µg de vector en un volumen final de 50 µl. Una vez digerido el vector, se procedió a su desfosforilación (para evitar el religado) con 4 U de *fosfatasa alcalina* a 37 °C durante 30 min. A continuación se corrieron en geles de 1% de agarosa de bajo punto de fusión (*low melting temperature agarose*) el vector digerido y desfosforilado, y el inserto digerido, para retirarle todos los reactivos y purificarlo en sólido, cortando las bandas correspondientes. Para la extracción del DNA y su separación de la agarosa, se utilizó el kit *GeneClean*. Una vez purificado, se procedió a la ligación de ambos, utilizando 6 U de *T4 DNA Ligasa* a 15 °C durante 16 h. El DNA ligado, se transformó en bacterias competentes *E. coli DH5α* mediante un choque térmico de 42 °C durante 1 min, creciendo en medio *LB* a 37 °C durante 1 h en *thermomixer comfort* a 900 rpm. Posteriormente, las bacterias se sembraron en placas *LB* + *antibiótico* apropiado y se incubaron durante 16 h a 37 °C. Al día siguiente se seleccionaron colonias y se crecieron en *LB* + *antibiótico* durante 16 h a 37 °C para realizar *Miniprep* y extraer DNA para su chequeo y comprobación de un correcto clonaje.

2.2. pcDNA3.1Nurr1-V5-6xHis:

Plásmido creado a partir del fragmento de Nurr1 salvaje procedente del vector pCMX-Nurr1 e insertándolo en el vector pcDNA3.1-V5-6xHis. pCMX-Nurr1 sirvió de molde para generar el inserto Nurr1 mediante PCR, con el uso de dos oligonucleótidos que introducen dos sitios de restricción en ambos extremos: EcoRV (*Forward*: 5'-TGCAGATATCATGCCTT GTGTTTCAGGCGCA-3') y NotI (*Reverse*: 5'-TCGAGCGGCCGCAAGGTAAGGT GTCCAGGAAA-3'). El inserto entra en marco de lectura con el vector pcDNA3.1-V5-6xHis añadiendo las etiquetas de V5 y 6xHis en el extremo carboxilo.

2.3. Deleciones de EGFPNurr1ΔMut-V5-6xHis:

Las deleciones NH3-terminal de Nurr1 fusionadas a la proteína verde fluorescente (EGFP) se crearon a partir de fragmentos extraídos por PCR, utilizando como molde el vector pcDNA3.1-Nurr1-V5-6xHis. Los oligonucleótidos utilizados son: Forward – Nurr1 salvaje (5'-AGTCAGATCTATG

CCTTGTGTTTCAGGCGCAGTATGGGTC-3'); Nurr1 Δ Mut1 (5'-AGTCAGATCTT TAGCATGGACCTCACCAACACTGAAAT-3'); Nurr1 Δ Mut2 (5'-AGTCAGATCT AAGACACCTGTCTCCCGCCTGTCACTC-3'); Nurr1 Δ Mut3 (5'-AGTCAGATCTT TCGACGGGCCTCTGCACGTCCCCATGAA-3'); Nurr1 Δ Mut4 (5'-AGTCAGATC TACTTGTGAGGGCTGCAAAGGTTTCTTT A-3'); Nurr1 Δ Mut5 (5'-AGTCAGAT CTGCCCACGTGCGATTCCAATCCGGCAAT GAC-3'); Reverse – común para todos (5'-GCATAAGCTTGAGGCTGATCAGCGGGTTTAAACTCAATG-3') e introducen dos sitios de restricción en ambos extremos: BglII extremo-5' y HindIII extremo-3'. Los insertos entran en marco con el vector pEGFP-CI añadiendo la proteína EGFP en el extremo amino de Nurr1 y sus delecciones.

3. Mutaciones.

3.1. Metodología:

Para realizar las diferentes mutaciones puntuales, utilizamos el protocolo que describe el kit comercial *Gene Tailor Site-Directed Mutagenesis System*. El procedimiento consistió inicialmente en introducir metilaciones en 100 ng de DNA molde (plásmido) mediante el uso de una DNA metilasa proporcionada por el kit. A continuación, se amplificaron 12.5 ng de DNA metilado mediante el uso de 2 U de *GC-Rich PCR System* y una mezcla de 2mM de *primers* sintéticos específicos que contienen la mutación a introducir (protocolo de diseño descrito en el kit) en un volumen de reacción final de 50 μ l. Una vez amplificado, se transformó en bacterias competentes *E. coli DH5 α* que degrada el plásmido metilado o parental (proporcionadas por el kit) y conserva el plásmido mutado. El procedimiento posterior es idéntico al descrito anteriormente en el método de clonaje. Para conocer si el plásmido contenía la mutación introducida, se procedió a la secuenciación de la zona, utilizando un oligonucleótido que hibrida aproximadamente 100 pb por encima de la zona donde se ha introducido la mutación (la secuenciación fue realizada por el Servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Aberto Sols”).

3.2. pCDNA3.1Nurr1-Mut2-V5-6xHis:

Esta mutación fue creada utilizando como molde el plásmido pcDNA3.1Nurr1-V5-6xHis. Los oligonucleótidos utilizados para generar el mutante Nurr1-Mut2 son: *Forward*: 5'- GGTCGGTTTACTACAAGCCCGCTGCGCCCCCGGCACCC GCCGCCCCGGCCTTCCAGGTGC - 3' y *Reverse*: 5'- GGGCTTGTAGTAAAC CGACCCGCTGT GTGG - 3'.

3.3. pCDNA3.1Nurr1-NES*-V5-6xHis:

Los mutantes fueron creados utilizando como molde el plásmido pcDNA3.1Nurr1-V5-6xHis. Los oligonucleótidos utilizados para generar los mutantes Nurr1-NES* son: Nurr1-NES1* (*Forward*: 5'-TTGAATCAGCTTTCTTA GAAGCATTTGCTCTGCGCGCAGCATACAGGT-3' y *Reverse*: 5'-TTCTAAGAA AGCTGATTCAAAAAGCAGGTC-3'), Nurr1-NES2* (*Forward*: 5'- GCACCCTTT GCACACAGGGCGCCCAGCGCGCTTTCTACGCGAAAGCGGAAGACTTGG- 3' y *Reverse*: GCCCTGTGTGCAAAGGGTGCGGAGTTCTGG-3'). El mutante Nurr1-NES1/2* fue generado a partir de los oligonucleótidos del mutante Nurr1-NES2*, utilizando como molde el plásmido pcDNA3.1Nurr1-NES1*.

3.4. pCDNA3.1Nurr1-NLS*-V5-6xHis:

Los mutantes fueron creados utilizando como molde el plásmido pcDNA3.1Nurr1-V5-6xHis. Los oligonucleótidos utilizados para generar los mutantes Nurr1-NLS* son: Nurr1-NLS1* (*Forward*: 5'-ATAAAACTGCCC AGTGGACGCGGCCGCGCAAATGCTTGTCAGTACT-3', *Reverse*: 5'-GTCCA CTGGGCAGTTTTTATTTGCTAAACA-3'), Nurr1-NLS2* (*Forward*: 5-TGGTTCG CACGGACAGTTTAGCAGGCGCGGCAGGTGCTTTACCCTCGGCGCCGGCG AGCCACAGG-3', *Reverse*: 5'-AAACTGTCCGTG CGAACCCTTCTTTAAC-3'). El mutante Nurr1-NLS1/2* fue generado a partir de los oligonucleótidos del mutante Nurr1-NLS2*, utilizando como molde el plásmido pcDNA3.1Nurr1-NLS1*.

3.5. pCDNA3.1Nurr1-IBOX*-V5-6xHis:

Los mutantes fueron creados utilizando como molde el plásmido pcDNA3.1Nurr1-V5-6xHis. Los oligonucleótidos utilizados para generar el mutante Nurr1-IBOX* son: Forward: 5'- ACCGACCCAACTACCTGTCTGCACT GGCGGCGAAGCTGGCAGAAGCCCGCACCCCTTT-3' y Reverse: 5'- AGACAG GTAGTTGGGTCGGTTCAAACCCCC- 3'

4. **Formación de proteínas quiméricas de EGFP.**

4.1. Metodología:

La fusión de las secuencias de exporte (NES1 y NES2) y las secuencias de importe de Nurr1 (NLS1 y NLS2) al extremo carboxilo de la proteína verde fluorescente (EGFP) se realizó sobre el plásmido pCI-EGFP. Se anillaron los oligonucleótidos complementarios (secuencias NES1, NES2, NLS1 y NLS2) a una concentración final de 100 pM a 80 °C durante 2 min, con una disminución progresiva de la temperatura hasta 4°C a razón de 1°C/min. A continuación, 50 pM de oligonucleotido anillado fue fosforilado en los extremos 5' con la *polinucleótido kinasa T4* con 1mM de ATP. Los oligonucleótidos están diseñados de tal manera que presentan en sus extremos las dianas de las enzimas ya cortadas, preparadas para introducir en el vector. A continuación, los procedimientos de digestión (con las enzimas apropiadas), desfosforilación y purificación en geles de agarosa de bajo punto de fusión del vector pCI-EGFP, método de ligación con las secuencias a introducir, transformación, extracción de DNA (*Miniprep*) y chequeo del clonaje, se realizó de la misma manera como se describe anteriormente en el método de clonaje.

4.2 pEGFP-NES:

El clonaje se realizó usando las enzimas de restricción Bgl II en el extremo 5' y BamHI en el extremo 3'. Los oligonucleótidos para generar pCI-EGFP-NES1 (*Forward*: 5'-GATCAGCTTTCTTAGAATTATTTGTTCTGCGCTTAGCATACAGGTCCAACG-3' y *Reverse*: 5'-TCCGTTGGACCTGTATGCTAAGCGCAGAACAAATAATTCTAAGAAAGCT-3'), pCI-EGFP-NES2 (*Forward*: 5'-GATCAACACAGGGCCTCCAGCGCATTTTCTACCTGAAATTGGAAGACTTGG-3' y *Reverse*: GATCCCAAGTCTTCCAATTTTCAGGTAGAAAATGCGCTGGAGGCCCTGTGTT-3')

4.3. pEGFP-NLS:

El clonaje se realizó usando las enzimas de restricción BglIII en el extremo 5' y BamHI en el extremo 3'. Los oligonucleótidos para generar pCI-EGFP-NLS1 (*Forward*: 5'-AATTTAGTGGACAAGCGCCCCGAAATCGTTGTCAGG-3' y *Reverse*: 5'-GATCCCTGACAACGATTTTCGGCGGCGCTTGTTCCACTA-3') y pCI-EGFP-NLS2 (*Forward*: 5'-GATCATTAAGGCGGAGAGGTCGTTTACCCTCGAAGCCGAAGAGCG-3' y *Reverse*: 5'-GATCCGCTCTTCGGCTTCGAGGGTAAACGACCTCTCCGGCCTTTT).

5. **Inmunofluorescencia en células.**

5.1. Inmunofluorescencia.

Las células HEK293T fueron sembradas en placas de 24 pocillos (75.000 células por pocillo) sobre cristales de 12 mm Ø tratados con poli-D-Lisina, cultivadas durante 16 h y transfectadas transitoriamente con fosfato cálcico. Después de 24 h de transfección, según donde proceda, se trataron las células con arsenito sódico a 100 µM durante 30 min y 60 min. A continuación, las células fueron lavadas tres veces con PBS a temperatura ambiente y fijadas con 4 % para-formaldehído durante 15 min en agitación. Después de tres lavados de 5 min con PBS, las células se permeabilizaron con 0,25% Nonidet P-40 durante 10 min en agitación. Luego, las células fueron lavadas tres veces con PBS y los cristales fueron incubados con los anticuerpos primarios durante

1 h y 30 min a 37 °C en atmosfera humidificada. Después de tres lavados de 5 min con PBS en agitación, los cristales de incubaron con el anticuerpo secundario durante 45 min en las mismas condiciones. Por ultimo, las células fueron lavadas tres veces durante 5 min con PBS. El primer lavado sirvió para teñir los núcleos con DAPI en PBS.

5.2. Microscopia confocal.

Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas usando los filtros apropiados en el microscopio Leica DMIRE2TCP SP5 confocal. Los láseres utilizados fueron Ar 488 nm de fluorescencia verde, Ar/HeNe 543 nm de fluorescencia roja y ArUV 351 nm 364 nm de fluorescencia UV. Las fotografías fueron tomadas a una resolución de 2048 por 2048 pixeles por punto. Las imágenes se tomaron con un objetivo de 63x/NA 1.4-0.6.

6. *Métodos bioquímicos*

6.1. Determinación de la concentración de proteínas por BCA.

La cantidad de proteína de los lisados celulares se determinó utilizando el kit D_o *Protein Assay*. Se utilizó una curva patrón con diluciones seriadas de una disolución de BSA a 2mg/ml para estimar las concentraciones de los lisados. Se sembraron según el manual de usuario del kit y se realizó el ensayo en un lector de placas *Benchmark Microplate Reader* a una longitud de onda de 690 nm.

6.2. Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas.

La electroforesis de proteínas se realizó siguiendo el método descrito en la bibliografía (Laemmli, 1970). Las proteínas, una vez separadas en el gel de poliacrilamida, se transfirieron mediante un sistema de transferencia húmeda a membranas *Immobilon-P* de 0.45 µm. Para la inmunodetección, las membranas fueron hidratadas con metanol durante 1 min y lavadas con tampón TTBS durante 5 min. A continuación, se añadió un agente bloqueante al 5% (leche desnatada) diluida en tampón TTBS durante 2 h a temperatura ambiente en

agitación. Luego, se procedió al lavado de la membrana con 3 lavado de tampón TTBS y se añadió el anticuerpo primario a la dilución adecuada en TTBS con BSA 0.4%, durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se procedió al lavado de la membrana con TTBS durante 30 min (tres lavados de 10 min cada uno) y se añadió el anticuerpo secundario a la dilución de 1:10.000 en TTBS y BSA 0.4%. Por ultimo, se repitió el lavado de la membrana con TTBS durante 30 min (tres lavados de 10 min cada uno). La membrana se reveló mediante el uso de una disolución comercial *ECL Advance*, y detectando las proteínas por quimioluminiscencia, mediante el uso de CHEMIBIS (DNR).

7. Transfecciones transitorias y ensayos

7.1. Ensayo de luciferasa.

Las células HEK293T fueron sembradas en placas de 24 pocillos (75.000 células por pocillo), cultivadas durante 16 h y transfectadas transitoriamente con los plásmidos reporteros de luciferasa pGL3-NBRE-Luc y pGL3-TkLuc utilizando fosfato cálcico. Después de 24 h de transfección, las células fueron lisadas con 100 μ l de tampón de lisis de un kit comercial de sistema de ensayo de luciferasa simple (Promega) y se emplearon 30 μ l del lisado para el ensayo de actividad luciferasa, realizado según el protocolo descrito por el fabricante. Las unidades relativas de luz (RLUs) fueron determinadas mediante el luminómetro GLOMAX 96.

7.2. Ensayo de fosfatasa λ

Las células HEK293T fueron sembradas en placas de 60 mm de diámetro (7×10^5 células por placa), cultivadas y transfectadas transitoriamente durante 24 h con fosfato cálcico. Las células fueron lavadas una vez con PBS frío y lisadas en hielo con tampón AkT sin inhibidores de fosfatasas. A continuación, las muestras se sonicaron y centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min, y 20 μ g de proteína se incuban con 1.000 unidades de fosfasa λ durante 4 h a 37

°C. Las muestras incubadas se resuelven en geles SDS-PAGE e inmunorevelan en membrana con anticuerpos necesarios.

7.3. Ensayo de vida media

Las células HEK293T fueron sembradas en placas de 60 mm de diámetro (7×10^5 células por placa), cultivadas y transfectadas transitoriamente durante 24 h con fosfato cálcico. Después de 24 h de transfección, según donde proceda, se trataron las células con cicloheximida 100 μ M durante 30 min, 1 h, 2 h y 3 h. Las células fueron lavadas una vez con PBS frío y lisadas en hielo con tampón de lisis RIPA. Posteriormente, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 min y se rescató el sobrenadante. Las muestras se resuelven en geles SDS-PAGE e inmunorevelan en membrana con los anticuerpos correspondientes.

7.4. Ensayo de estabilidad.

Las células MN9D y HEK293T fueron sembradas en placas de 60 mm de diámetro (7×10^5 células por placa). Las células HEK293T fueron transfectadas transitoriamente con fosfato cálcico y después de 24 h de transfección, según donde proceda, se trataron las células con LiCl a 50 mM y con MG132 a 40 μ M durante 6 h. Las células fueron lavadas una vez con PBS frío y lisadas en hielo con tampón de lisis RIPA. Posteriormente, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 min y se rescató el sobrenadante. Las muestras se resuelven en geles SDS-PAGE e inmunorevelan en membrana con los anticuerpos correspondientes.

7.5. Ensayo de fraccionamiento subcelular.

Las células MN9D, SH-SY5Y y HEK293T fueron sembradas en placas de 60 mm de diámetro (7×10^5 células por placa). Las células HEK293T fueron cultivadas y transfectadas transitoriamente con fosfato cálcico y después de 24h de transfección, según donde proceda, se trataron las células con arsenito sódico a 100 μ M durante 30 min y 60 min. Las fracciones citosólicas y nucleares fueron preparadas como se describe previamente (Minc *et al*, 1999). Brevemente, las células fueron lavadas tres veces con PBS frío y recogidas por

centrifugación a 1.000 rpm durante 10 min. El precipitado celular fue resuspendido cuidadosamente en tres volúmenes de tampón A frío. Después, el homogeneizado se centrifugó a 500 x g durante 5 min. El sobrenadante corresponde a la fracción citosólica y se rescató para resolverlo en geles SDS-PAGE e inmunorevelado en membrana con los anticuerpos correspondientes. El precipitado nuclear se resuspendió en cinco volúmenes de tampón B frío y se centrifugó a 500 x g durante 5 min. A continuación, se eliminó el sobrenadante y el precipitado nuclear se resuspendió en dos volúmenes de tampón C hipertónico. El homogeneizado se incubó durante 30 min a 4 °C en una rueda giratoria. Después, los restos nucleares se eliminaron por centrifugación a 900 x g durante 20 min a 4 °C, se rescató el sobrenadante y se resolvió en geles SDS-PAGE para su inmunorevelado en membrana con los anticuerpos correspondientes.

8. Programas informáticos.

8.1. NesNES 1.1

Este programa se utilizó para encontrar secuencias candidatas a señales de exporte nucleares (NES) en la secuencia primaria de Nurr1.

8.2. NesPhos 2.0

Este programa se utilizó para predecir posibles secuencias candidatas en la secuencia primaria de una proteína a ser sustrato de diferentes quinasas (en función de la base de datos del programa) sobre la secuencia primaria de una proteína.

9. Análisis de datos.

9.1. Análisis densitométrico y estadística

Las diferentes intensidades de bandas en los *immunoblots* (unidades arbitrarias de densidad), correspondientes a la detección de las muestras de proteínas en

inmunorevelado en membrana, fueron cuantificadas utilizando un programa *MCIDTM* software (MCID, Cambridge, Reino Unido). Se utilizó el test estadístico t de Student's para evaluar los diferentes grupos; un *P* valor de <0.05 fue considerado significativo. Salvo que se indique, todos los experimentos fueron realizados por triplicado con resultado similar. Los valores de las gráficas corresponden a las medias de al menos tres muestras. Las barras de error indican las desviaciones estándar (SD).

Se utilizó el programa especializado *GraphPad Prism[®]* para realizar los estudios estadísticos. Se utilizó el test t de Student's para comparar entre dos grupos o la ANOVA de una vía, en los casos que correspondía.

9.2. Gráficos y otros.

Los gráficos se realizaron en el programa especializado *GraphPad Prism[®]*. Para el ajuste de fotografías se utilizó el programa *Adobe Photoshop[®]* y para la creación de las figuras se utilizó el programa *CorelDraw[®]*.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE NURR1

1.1. Nurr1 presenta una localización preferentemente nuclear.

Con el fin de establecer la distribución basal de Nurr1, realizamos fraccionamientos subcelulares en líneas dopaminérgicas humanas SH-SY5Y y de ratón MN9D. Como se muestra en la Fig. 1A, las células SH-SY5Y presentaron una localización de Nurr1 mayoritariamente nuclear, con una pequeña proporción citosólica. Esta misma distribución se encontró en las células MN9D (Fig. 1B), indicando que este reparto intracelular está conservada entre diferentes especies. A continuación se determinó la localización subcelular de Nurr1 en un modelo celular de transfección transitoria, utilizando un vector de expresión que lleva la versión salvaje de Nurr1 de ratón fusionada a una etiqueta V5 (Fig. 1C). Como se observa en la Fig. 1D, en ensayos de fraccionamiento subcelular en células HEK293T transfectadas transitoriamente con esta versión de Nurr1-V5 mantuvo el mismo patrón de distribución subcelular observado en las células dopaminérgicas SH-SY5Y y MN9D. En todos los casos se analizó también la localización de las proteínas β -actina (preferentemente citosólica) y lámina B (proteína nuclear), como controles para el fraccionamiento subcelular. Como abordaje adicional para confirmar la distribución de Nurr1, se realizó una inmunofluorescencia en células HEK293T (Fig. 1E) transfectadas con el vector de expresión para Nurr1-V5. La inmunofluorescencia con anticuerpo anti-V5 demostró una distribución preferentemente nuclear, en concordancia con los datos obtenidos en el fraccionamiento subcelular. Estos resultados indican que Nurr1 tiene una distribución heterogénea, con una localización principalmente nuclear y con una pequeña proporción citosólica. Dado que la distribución de Nurr1 en las células dopaminérgicas es similar a la observada en células HEK293T transfectadas con Nurr1-V5, utilizaremos este modelo de transfección transitoria para estudiar el control de la localización subcelular de Nurr1 mediante mutagénesis.

RESULTADOS

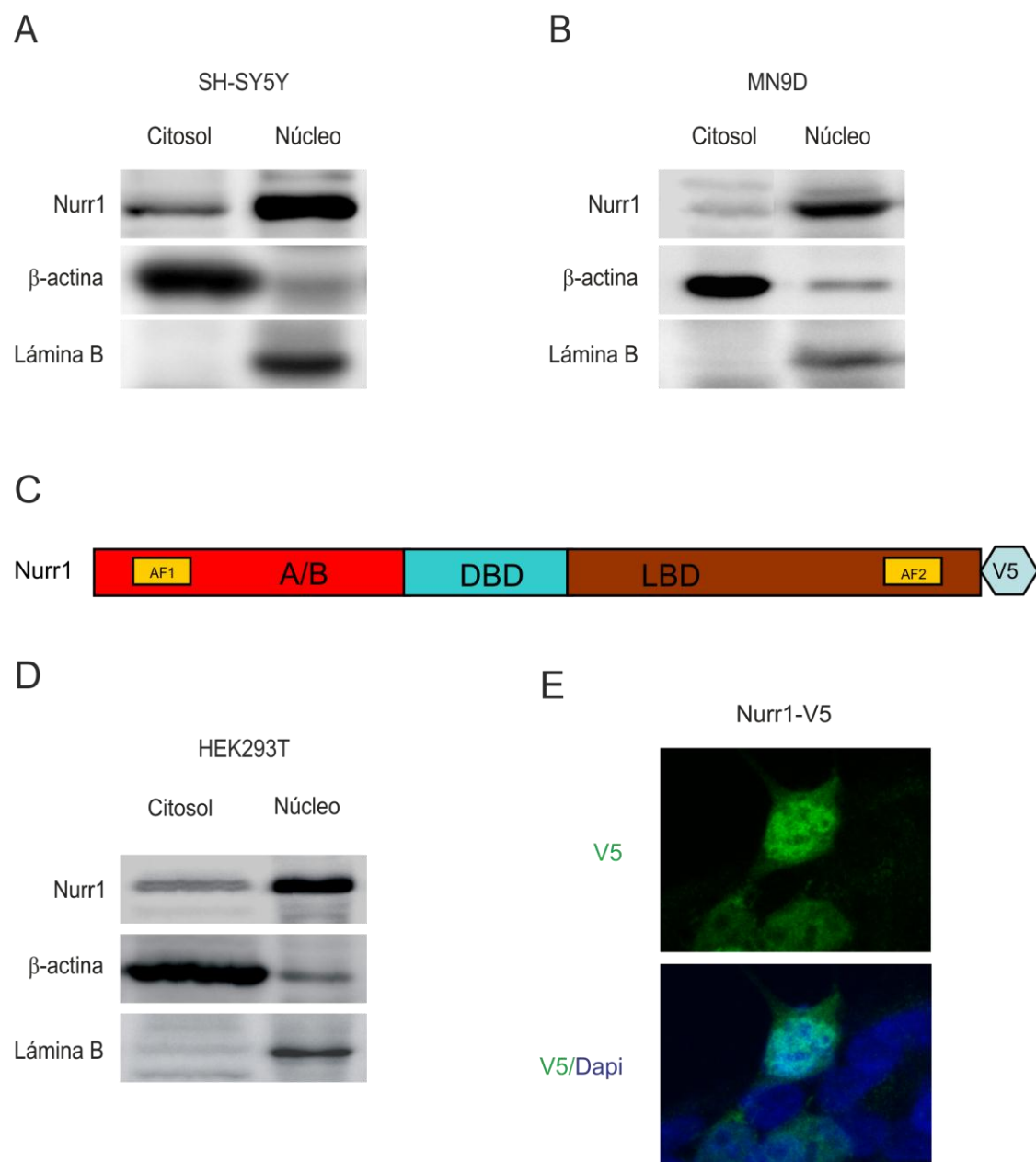


Figura 1. Distribución subcelular de Nurr1. **A y B,** Fracción citosólica (C) y nuclear (N) en líneas celulares dopaminérgicas SH-SY5Y y MN9D mostrando la localización subcelular endógena de Nurr1. **C,** Esquema del cDNA salvaje de Nurr1 de ratón fusionado a la etiqueta V5, clonado en el vector de expresión pCDNA3.1-V5His6x. **D,** Fracción citosólica (C) y nuclear (N) en células HEK293T transfectadas con el vector de expresión pCDNA3.1-Nurr1-V5His6x mostrando la distribución subcelular de Nurr1 ectópico. *Paneles superiores,* inmunoblot con anticuerpo anti-Nurr1 o anti-V5, *Paneles intermedios,* inmunoblot con anticuerpo anti-β-actina como control de carga de la proteína citosólica, *Paneles inferiores,* inmunoblot con anti-Lamina B como control de carga de la proteína nuclear. **E,** Análisis de la distribución subcelular por inmunofluorescencia en células HEK293T transfectadas con Nurr1-V5 salvaje y analizadas con anticuerpo anti- V5 (verde) y núcleos teñidos con DAPI (azul).

1.2. Identificación de dos señales de importe en Nurr1.

Puesto que estos resultados indican que Nurr1 es una proteína preferentemente nuclear, decidimos analizar si la secuencia de Nurr1 contiene señales de importe nuclear, NLS (*Nuclear Localization Signal*). Las secuencias NLS están constituidas principalmente por aminoácidos básicos, preferentemente lisinas y argininas, pudiéndose organizar de dos formas diferentes: NLS consenso, siguiendo un patrón establecido de **ZZX₍₁₀₋₂₀₎ZZZZ**, donde “Z” son lisinas o argininas y “X” es cualquier aminoácido; NLS no consenso o atípica, donde el patrón no está conservado, siendo una zona rica en aminoácidos básicos. El análisis *in silico* de la secuencia de Nurr1 sugiere la existencia de una NLS dividida en dos regiones que denominamos NLS1 y NLS2 (Fig. 2A). Ambas secuencias se encuentran localizadas en el dominio DBD de unión al DNA. De ellas, la secuencia NLS1 corresponde a la forma consenso (Fig. 2B) cuando la comparamos con otras secuencias NLSs de proteínas nucleares. La secuencia NLS2 corresponde a una forma no consenso o atípica (Fig. 2B) comparada con otras señales NLSs que no siguen el patrón clásico. Mediante un alineamiento de secuencias, observamos que ambas están muy conservadas entre miembros de la misma familia de receptores huérfanos (Fig. 2C) y entre especies (Fig. 2D).

Para determinar si realmente estas secuencias participan en el importe de Nurr1, realizamos mutaciones en cada una de ellas. Obtuvimos dos mutantes, Nurr1-NLS1* y Nurr1-NLS2* de estas zonas, cambiando lisinas y argininas por alaninas, como se ilustra en la Fig. 3A. Se realizó un tercer mutante Nurr1-NLS1/2*, introduciendo las dos mutaciones sobre la secuencia primaria. La distribución subcelular de estos mutantes se analizó mediante fraccionamiento subcelular e inmunofluorescencia en células HEK293T transfectadas con Nurr1 salvaje y con los mutantes Nurr1-NLS1*, Nurr1-NLS2* y Nurr1-NLS1/2*. En la Fig. 3B se observa una distribución preferentemente citosólica de los mutantes en comparación con Nurr1 salvaje, que fue confirmada con los experimentos de inmunofluorescencia (Fig. 3C).

RESULTADOS

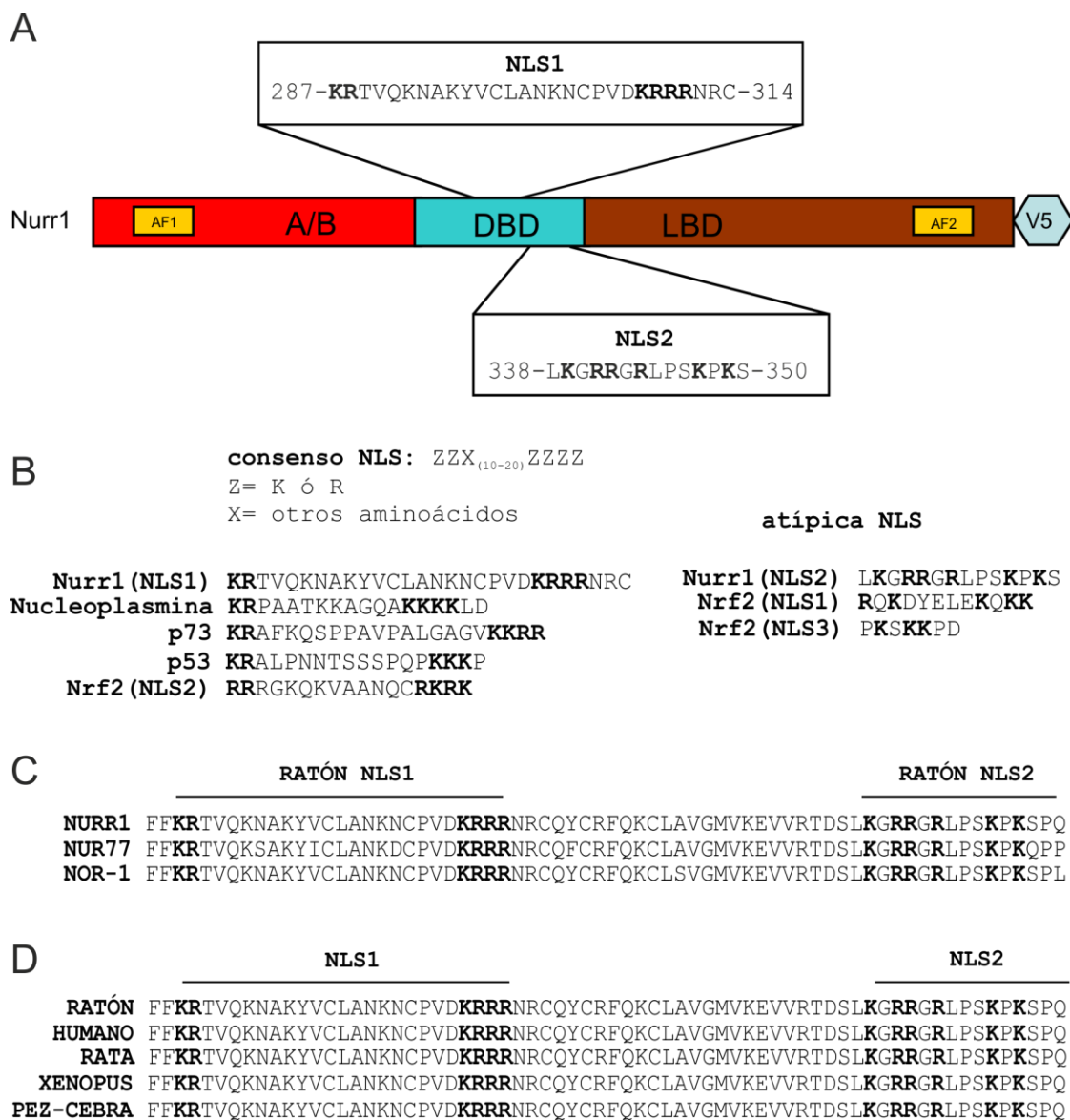


Figura 2. Identificación de una secuencia NLS bipartita en Nurr1. **A**, Estructura primaria de Nurr1 de ratón que representa la secuencia de aminoácidos entre 287-314 y 338-350 correspondiente a las posibles secuencias bipartitas NLS1 y NLS2. **B**, Comparación de la posible secuencia bipartita NLS1 y NLS2 de Nurr1 con NLSs de otras proteínas nucleares. **C**, Comparación de las posibles NLS1 y NLS2 con otros miembros de la familia de los receptores huérfanos. **D**, Conservación filogenéticas de las posibles secuencias NLS1 y NLS2 entre diferentes especies. Los residuos señalados corresponden a los posibles sitios que conforman las secuencias NLS consenso y atípicos

Por otra parte, analizamos la funcionalidad de esta secuencia bipartita utilizando la versión Nurr1-NLS2* en un ensayo de luciferasa con un plásmido reportero de Nurr1 que posee tres elementos de respuesta repetidos en tándem dirigiendo la expresión de luciferasa (NBRE-Luc). Para este ensayo utilizamos Nurr1-NLS2*, por ser una NLS atípica. Como muestra la Fig. 3D, la versión salvaje de Nurr1 activó de manera dosis dependiente este reportero

RESULTADOS

mientras que Nurr1-NLS2* fue incapaz de activar este reportero a las mismas dosis. El conjunto de estos resultados muestra que las secuencias de importe NLS1 y NLS2 constituyen una secuencia NLS bipartita y que ambas secuencias son necesarias para la localización de Nurr1 en el núcleo.

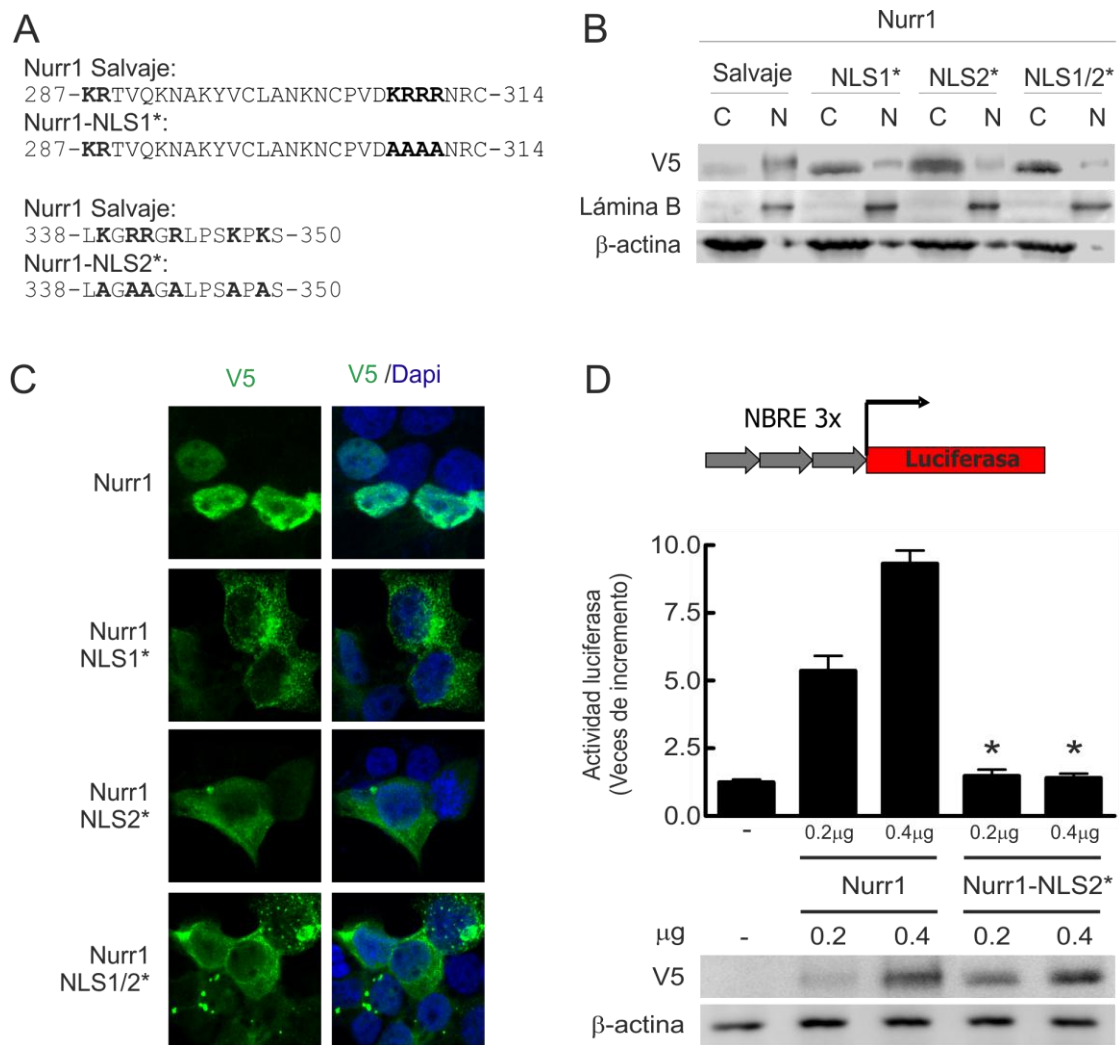


Figura 3. Nurr1 requiere de ambas NLS1 y NLS2 para localizarse en el núcleo. **A**, Esquema de los mutantes Nurr1-NLS1* y del mutante Nurr1-NLS2* (las letras en negrita señalan los aminoácidos mutados en la secuencia salvaje). **B**, Análisis de la distribución subcelular de Nurr1 salvaje, Nurr1-NLS1*, Nurr1-NLS2* y Nurr1-NLS1/2* en células HEK293T transfectadas y revelado contra la etiqueta V5. Fracción citosólica (C) y nuclear (N). **C**, Análisis de la localización subcelular por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-V5 en células HEK293T transfectadas con Nurr1 salvaje, Nurr1-NLS1*, Nurr1-NLS2* y Nurr1-NLS1/2*, revelando contra la etiqueta V5 (verde) y los núcleos teñidos con DAPI (azul). **D**, Inducción del reportero de luciferasa NBRE3x por la expresión ectópica de Nurr1 salvaje y Nurr1-NLS2* en células HEK293T. Las células fueron co-transfectadas con vector vacío o los vectores de expresión para Nurr1 salvaje o Nurr1-NLS2* (0.2 y 0.4 μg) junto con NBRE3x-Luc o pGL-TkLuc como control. Las células fueron incubadas durante 16 h en condiciones sin suero para analizar la actividad luciferasa. Cada punto es la media ± SD de n=3 muestras. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas con p<0.05. Se realizó un inmunoblot de células transfectadas con Nurr1 salvaje y Nurr1-NLS2* para mostrar igualdad de expresión.

RESULTADOS

Para determinar si estas NLSs pueden funcionar de manera aislada, fabricamos proteínas quiméricas con la proteína verde fluorescente, EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). Fusionamos las secuencia NLS1 o NLS2 en el extremo carboxi-terminal y se transfectaron en células HEK293T con sus vectores de expresión (Fig. 4A). EGFP presentó una distribución nuclear y citosólica con niveles más elevados en el núcleo. Por otra parte, como se muestra en la Fig. 4B, EGFP-NLS1 exhibió una distribución similar a la de la proteína EGFP. Sin embargo, EGFP-NLS2 presentó una distribución estrictamente nuclear, observándose además su acumulación en cuerpos nucleares. Estos resultados indican que, aunque ambas NLS1 y NLS2 son requeridas para conducir a Nurr1 hasta el núcleo celular, la secuencia NLS2 es lo bastante fuerte como realizar esta función por si sola.

A

EGFP-NLS1: EGFP-DKRRRNRC

EGFP-NLS2: EGFP-LKGRRGRLPSKPKS

B

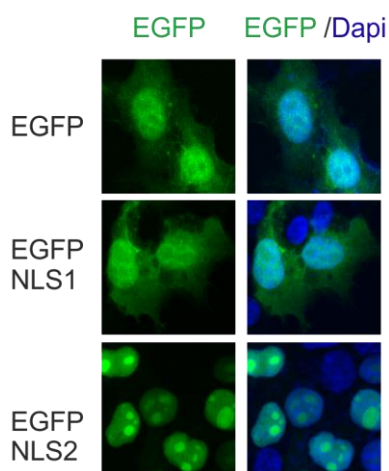


Figura 4. Solamente la secuencia NLS2 y no la NLS1, es suficiente para localizar a la EGFP en el núcleo. **A**, Esquema de las proteínas de fusión de EGFP con NLS1 o NLS2 de Nurr1. **B**, Análisis de la localización subcelular por inmunofluorescencia directa de EGFP (verde) en células HEK293T transfectadas con las proteínas fusión EGFP-NLS1 y EGFP-NLS2 y los núcleos en azul (DAPI).

1.3. Identificación de dos señales de exporte en Nurr1.

Las señales NES se caracterizan por tener una secuencia consenso de leucinas $LX_{(1-3)} LX_{(2-3)} LXL$, donde “X” es cualquier aminoácido y que son reconocidas por exportinas como CRM1 (*Chromosome Region Maintenance*, también denominado *Exportin 1* o *XPO1*) (Kosugi *et al*, 2008). Usando un programa informático NetNES 1.1, encontramos dos secuencias NES candidatas en la región LBD (unión a ligando) como ilustra en la Fig. 5A. Ambas secuencias mantienen un alto grado de similitud con NES de otras proteínas sometidas a un movimiento entre el núcleo y citoplasma como por ejemplo I κ B- α , TFIIIA, hDM2, p53, p73, PKI- α y Nrf2 (Fig. 5B). Además, ambas secuencias están conservadas en los otros dos receptores huérfanos Nur77 y Nor1 (Fig. 5C y 5E) y entre Nurr1 de diversos vertebrados incluyendo ratón, humano, rata, xenopus y pez cebra (Fig. 5D y 5F).

En primer lugar, para determinar si estas secuencias están realmente implicadas en el exporte de la proteína, realizamos estudios mediante mutagénesis puntual sobre estas señales. Se generaron dos mutantes Nurr1-NES1* y Nurr1-NES2*, por mutagénesis de varias leucinas a alaninas (Fig. 6A, letra en negrita). Se realizó un tercer mutante Nurr1-NES1/2*, introduciendo las dos mutaciones sobre la secuencia primaria de Nurr1. Para determinar si estos mutantes responden o no a la exportina CRM1 realizamos un fraccionamiento subcelular en células HEK293T co-transfectando Nurr1 salvaje o los mutantes Nurr1-NES1*, Nurr1-NES2* y Nurr1-NES1/2* con o sin CRM1. La sobre-expresión de CRM1 aumentó la proporción de Nurr1 salvaje en el citoplasma (Fig. 6B), mientras que los mutante Nurr1-NES1* (Fig. 6C), Nurr1-NES2* (Fig. 6D) y Nurr1-NES1/2* (Fig. 6E) no respondieron a la sobre-expresión de CRM1. Estos resultados se complementaron mediante análisis por inmunofluorescencia en células HEK293T co-transfectadas en las mismas condiciones (Fig. 6F). Este abordaje también permitió observar que a diferencia de Nurr1 salvaje, los mutantes Nurr1-NES1*, Nurr1-NES2* y Nurr1-NES1/2* fueron insensibles al exporte inducido por CRM1.

RESULTADOS

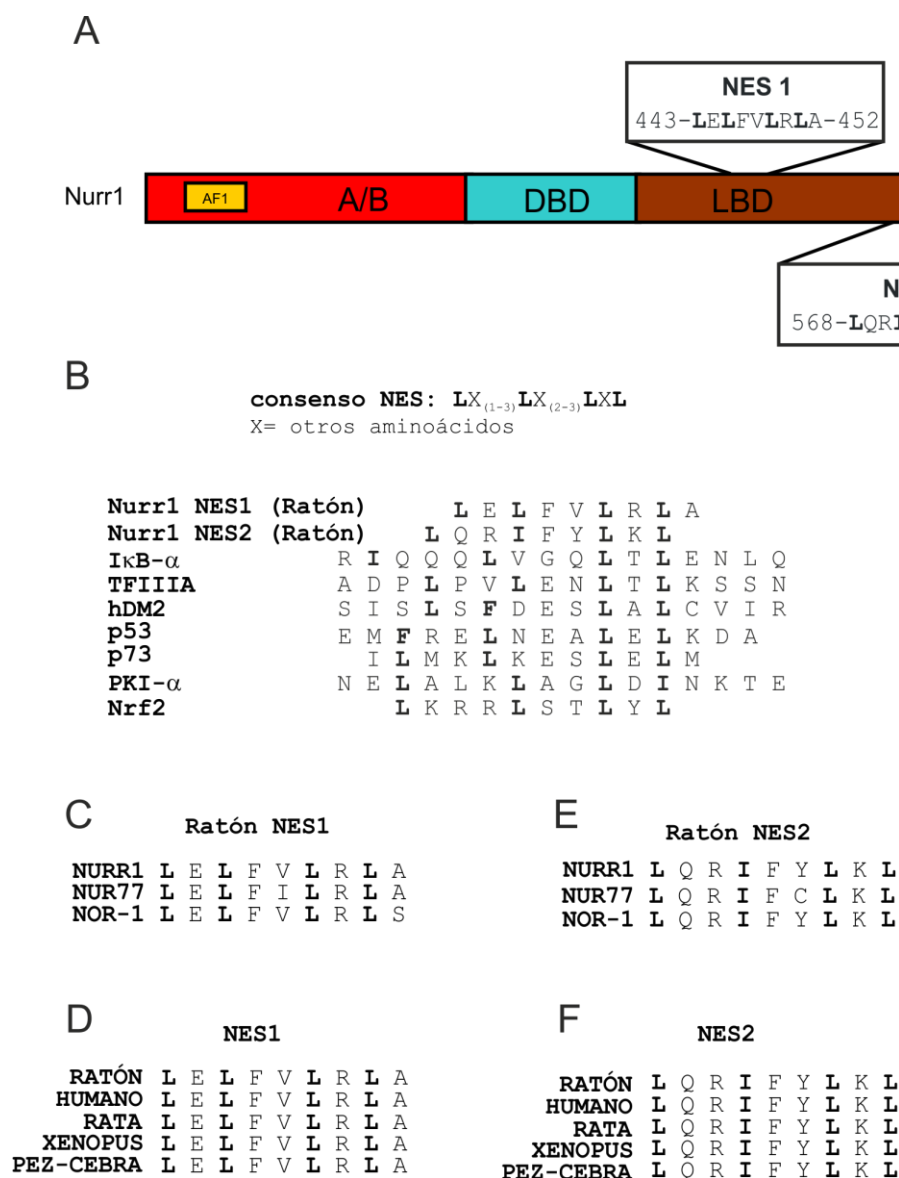


Figura 5. Identificación de dos secuencias NES en Nurr1. **A** Estructura primaria de Nurr1 de ratón que representa las secuencias de aminoácidos entre 443-452 y 568-577 correspondientes a las posibles secuencias NES1 y NES2. **B**, Comparación de las dos posibles secuencias NES1 y NES2 de Nurr1 con otras proteínas nucleares. **C** y **E**, Comparación de las secuencias NES1 y NES2 con otros miembros de la familia de los receptores huérfanos. **D** y **F**, Conservación filogenéticas de las secuencias NES1 y NES2, entre diferentes especies. Los residuos señalados corresponden a los posibles sitios que conforman las secuencias NES consenso.

RESULTADOS

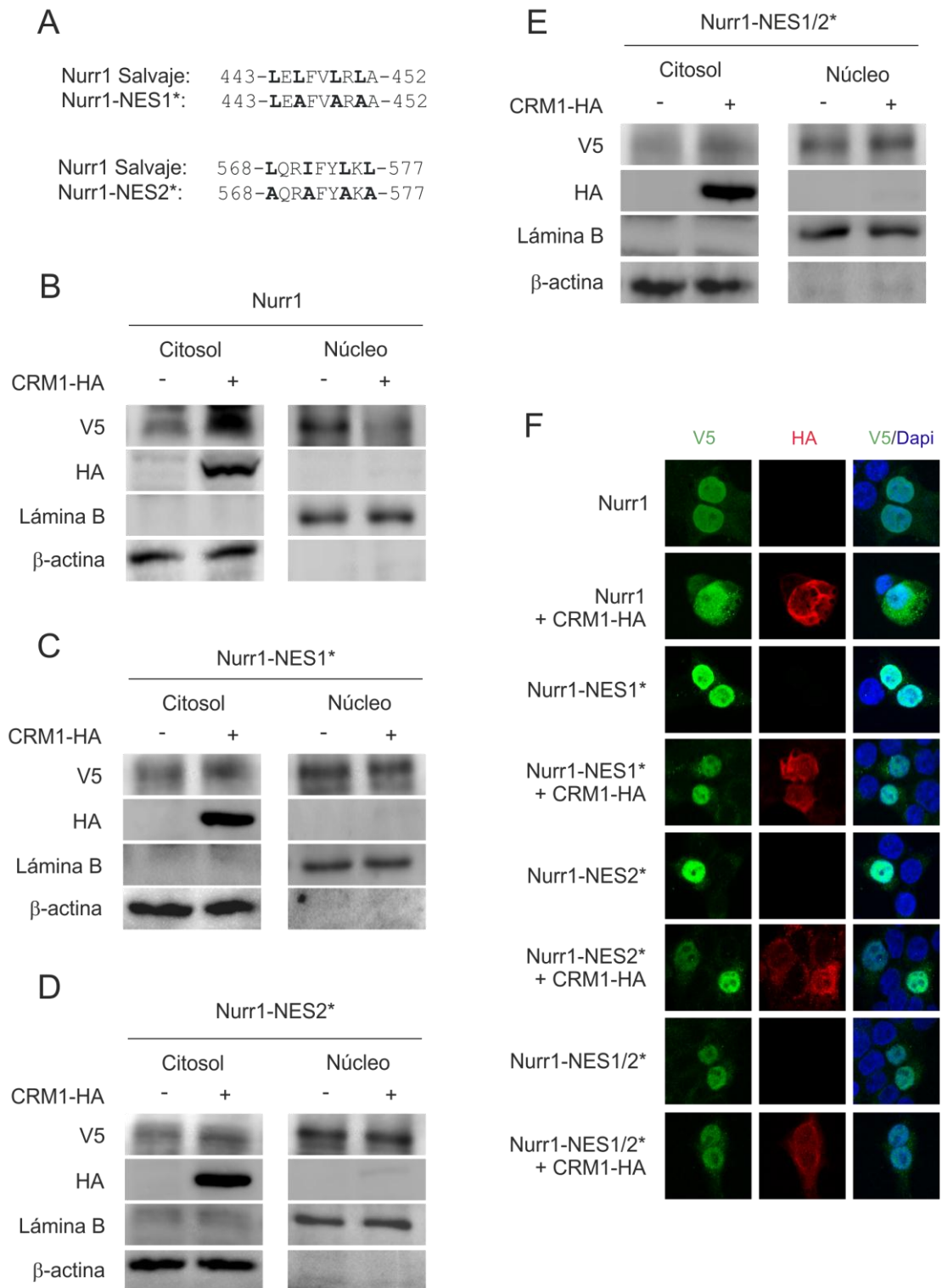


Figura 6. La exportina CRM1 induce el exporte de Nurr1 a través de las señales NES1 y NES2. **A**, Esquema de los mutantes Nurr1-NES1* y del mutante Nurr1-NES2* (las letras en negrita señalan los aminoácidos mutados en la secuencia salvaje). **B**, **C**, **D** y **E**, Análisis de la distribución subcelular de Nurr1 salvaje, Nurr1-NES1*, Nurr1-NES2* y Nurr1-NES1/2* en células HEK293T co-transfectadas con CRM1-HA, revelado contra la etiqueta V5 y la etiqueta HA. **F**, Análisis de la localización subcelular por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-V5 y anti-HA en células HEK293T co-transfectadas con Nurr1 salvaje, Nurr1-NES1*, Nurr1-NES2* y Nurr1-NES1/2* con CRM1 y revelando contra la etiqueta V5 (verde), etiqueta HA (rojo) y los núcleos teñidos con DAPI (azul)

RESULTADOS

Para determinar si estas señales NESs pueden funcionar individualmente, decidimos fusionarlas a proteínas EGFP sin localización subcelular regulada. Para ello, construimos dos proteínas quiméricas EGFP-NES1 y EGFP-NES2 (Fig. 7A), y analizamos la distribución de estas proteínas mediante microscopía de fluorescencia. Las células HEK293T fueron transfectadas con vectores de expresión para EGFP, EGFP-NES1 y EGFP-NES2 y para la exportina CRM1 como se ilustra en la Fig. 7B. Se observa que la distribución de EGFP no estaba alterada por la sobre-expresión de CRM1 (los dos paneles superiores). Sin embargo, EGFP-NES1 se encontró en el citoplasma, con independencia de la sobre-expresión de CRM1 (los dos paneles centrales). Por último, EGFP-NES2 presentó una distribución similar a la de la proteína EGFP, pero en presencia de CRM1, su localización fue preferentemente citosólica (los dos paneles inferiores). Estos experimentos demuestran que las secuencias NES1 y NES2 son necesarias y suficientes para inducir el transporte nuclear de Nurr1 y que la afinidad de la secuencia NES1 con CRM1 es mayor que la secuencia NES2, ya que necesita de una sobre-expresión de CRM1 para poder inducir su transporte.

RESULTADOS

A

EGFP-NES1: EGFP-LELFVLRRLA

EGFP-NES2: EGFP-LQRIFYLKL

B

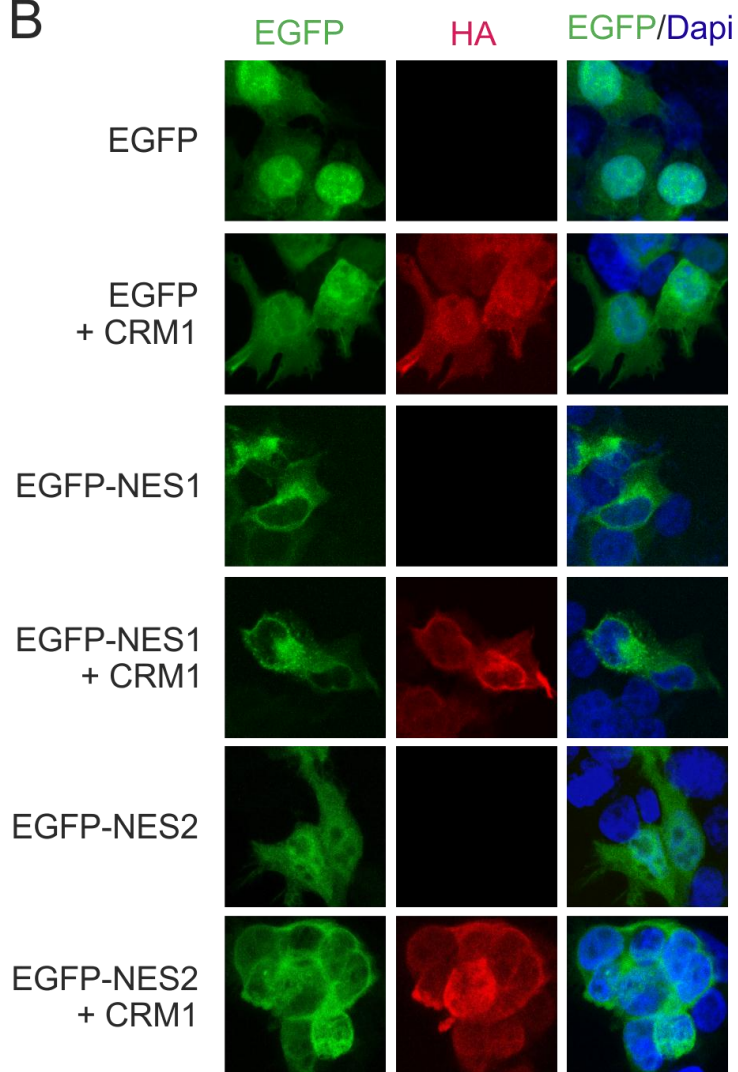


Figura 7. Las secuencias NES1 y NES2 son suficientes para inducir el exporte de la proteína EGFP al citoplasma. **A**, Esquema de las proteínas de fusión de EGFP con NES1 o NES2 de Nurr1. **B**, Análisis de la localización subcelular de las proteínas de fusión EGFP-NES1 y EGFP-NES2 en células HEK293T co-transfectadas con CRM1, revelado por inmunofluorescencia directa de EGFP (verde), anticuerpo anti-HA (rojo) y los núcleos teñidos con DAPI (azul).

RESULTADOS

1.4. La degradación basal de Nurr1 es independiente de su localización subcelular.

En base a los resultados anteriores, decidimos utilizar las versiones mutantes de localización subcelular de Nurr1, para determinar si su degradación está condicionada por el compartimiento subcelular donde se encuentre. Las células HEK293T se transfectaron con Nurr1 salvaje, el mutante de exporte Nurr1-NES1* y el de importe Nurr1-NLS2*, y posteriormente se trataron con cicloheximida 100 μ M (inhibidor de la síntesis de proteínas). Las células se lisaron tras 30 min, 60 min, 120 min y 180 min del tratamiento. Como se ilustra en la Fig. 8 las vidas medias de Nurr1 salvaje (Fig. 8A) y de los mutantes Nurr1-NES1* (Fig. 8B) y Nurr1-NLS2* (Fig. 8C) son aproximadamente iguales, en torno a los 100 min (Fig. 8D). Estos resultados indican que la localización subcelular de Nurr1 en condiciones basales, no condiciona su estabilidad.

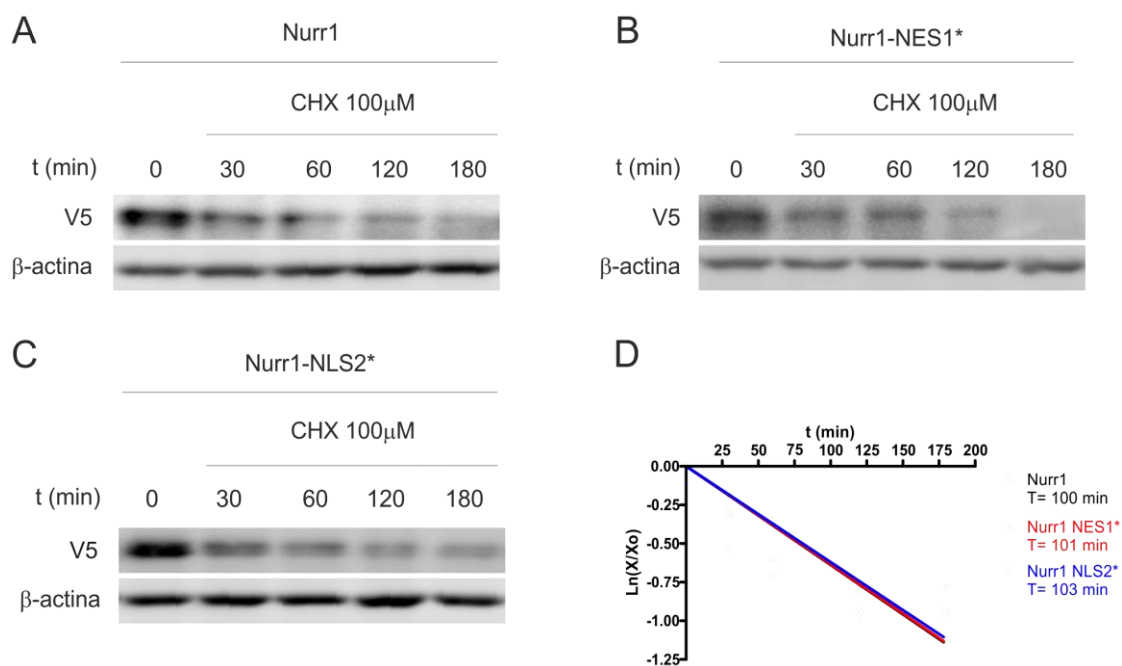


Figura 8. La localización subcelular de Nurr1 basal no condiciona su estabilidad. **A, B y C,** Análisis de la estabilidad de Nurr1 salvaje, Nurr1-NES1* y Nurr1-NLS2* en células HEK293T transfectadas y posteriormente tratadas con cicloheximida 100 μ M durante 30 min, 60 min, 120 min, 180 min. **(D),** Representación gráfica de las vidas medias de Nurr1 salvaje (negro), Nurr1-NES1* (rojo) y Nurr1-NLS2* (azul) normalizadas con los niveles de β -actina.

1.5. El estrés oxidativo induce el exporte de Nurr1 utilizando la secuencia NES2.

El estrés oxidativo afecta a la localización subcelular de diversas proteínas. Por tanto, nos propusimos determinar si la localización de Nurr1 es susceptible de regulación por arsenito, un inductor clásico de estrés oxidativo y mitocondrial. Primero realizamos experimentos de inmunofluorescencia en células HEK293T transfectadas con la versión salvaje de Nurr1 o los mutantes Nurr1-NES1*, Nurr1-NES2* y Nurr1-NES1/2*. Estas células fueron tratadas con arsenito sódico (100 μ M) durante 30 min y 60 min (Fig. 9A). Estos tiempos de tratamiento son más cortos que la vida media de Nurr1 que es de unos 100 min (Fig. 8). De esta manera evitamos la posible interferencia causada por la nueva síntesis de Nurr1. En la Fig. 9 se puede observar que el tratamiento con arsenito sódico induce un vaciado de la proteína nuclear y un incremento en la proporción citosólica de Nurr1 a los tiempos estudiados, sugiriendo que el estrés oxidativo induce el exporte de Nurr1 al citoplasma. Por otra parte, el arsenito sódico indujo el exporte de Nurr1-NES1*, mientras que las versiones Nurr1-NES2* y Nurr1-NES1/2* no respondieron a este tratamiento. Estos resultados indican que el estrés oxidativo promueve el exporte de Nurr1 mediante activación de la secuencia NES2.

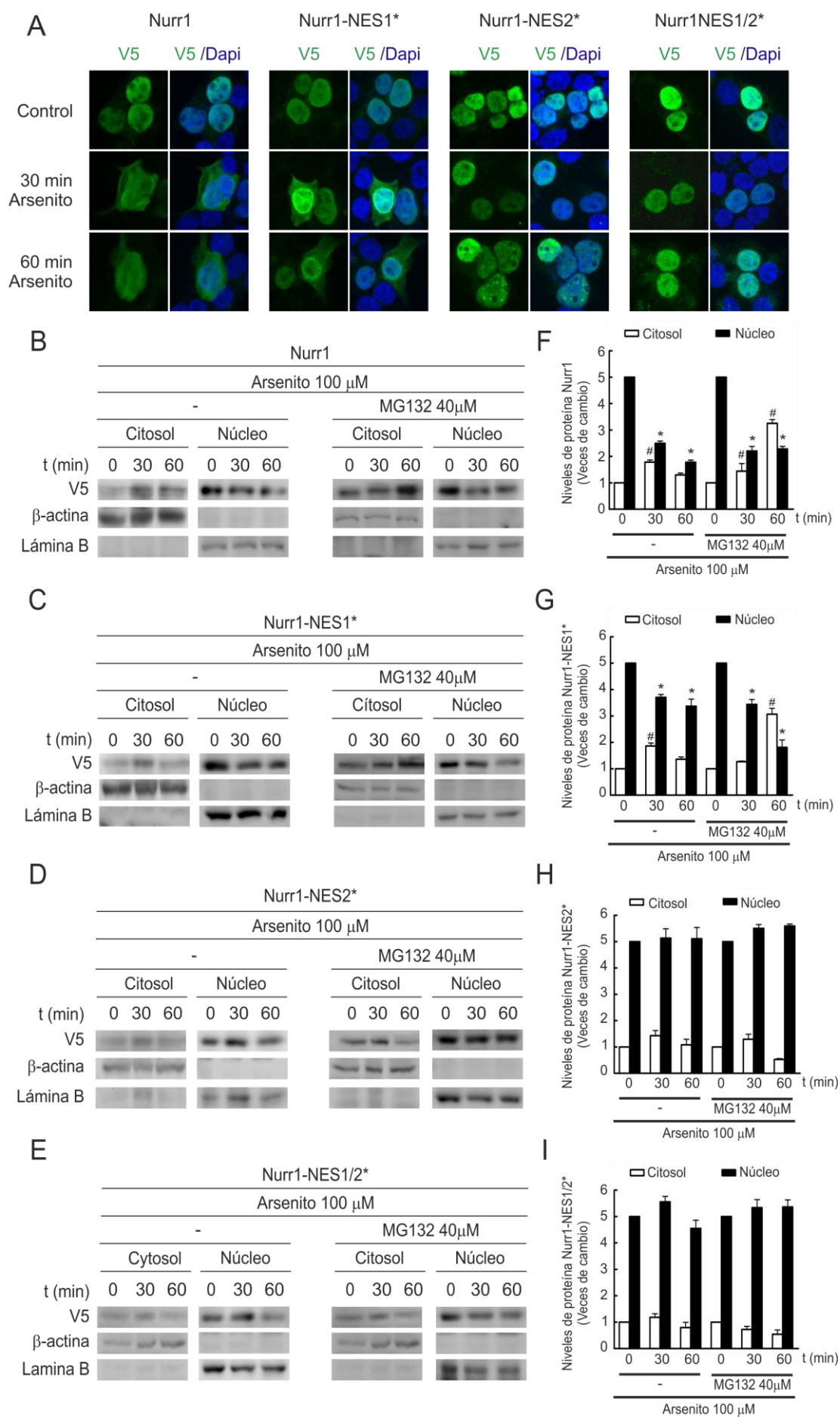
Como abordaje alternativo, realizamos fraccionamientos subcelulares en células HEK293T en las mismas condiciones. El arsenito sódico indujo una disminución de Nurr1 en la fracción nuclear y un aumento en la fracción citosólica a los tiempos estudiados, indicando de nuevo que el estrés oxidativo induce un cambio en la localización subcelular de Nurr1 (Fig. 9B). En relación con los mutantes NES, el arsenito sódico indujo el exporte de la versión Nurr1-NES1* (Fig. 9C), mientras que las versiones Nurr1-NES2* (Fig. 9D) y Nurr1-NES1/2* (Fig. 9E) no respondieron al tratamiento. Estos resultados coinciden con las observaciones anteriores realizadas mediante el análisis de inmunofluorescencia e indican que la secuencia NES2 y no la NES1 es la responsable del exporte de Nurr1 inducido por estrés oxidativo.

RESULTADOS

Un resultado sorprendente de este análisis fue que los niveles de proteína Nurr1 detectados en los fraccionamientos subcelulares disminuyó a los 60 min de tratamiento incluso en la fracción citosólica (Fig. 9). Con el fin de determinar si la disminución de los niveles de Nurr1 podría estar asociada a su degradación proteasómica en respuesta a estrés oxidativo, decidimos reproducir el mismo experimento en presencia del inhibidor del proteasoma MG132 (40 μ M). Como se observa en las Fig. 9B y Fig. 9C la presencia del MG132 provocó un aumento de la cantidad de proteína Nurr1 salvaje y del mutante Nurr1-NES1* en las fracciones citosólicas destacando la acumulación tras 60 min de tratamiento. Sin embargo, la fracción nuclear no sufrió cambios apreciables, observándose la misma caída de los niveles de proteína en presencia y ausencia de MG132. Por otro lado, como se observa en las Fig. 9D y Fig. 9E, la presencia del MG132 no produjo cambios en la cantidad de proteína nuclear de Nurr1-NES2* y Nurr1-NES1/2*. Este experimento indica que el exporte de Nurr1 inducido por el arsenito sódico, provoca su degradación en el citoplasma mediante un mecanismo dependiente de proteasoma.

Figura 9. El arsenito sódico induce el exporte de Nurr1 a través de la señal NES2. **A**, Análisis de la localización subcelular por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-V5 en células HEK293T transfectadas con Nurr1 salvaje, Nurr1-NES1*, Nurr1-NES2* y Nurr1-NES1/2*, tratadas con arsenito sódico (100 μ M) durante 30 min y 60 min, revelando contra la etiqueta V5 (verde) y los núcleos teñidos con DAPI (azul). **B, C, D y E**, Análisis de la distribución subcelular de Nurr1 salvaje, Nurr1-NES1*, Nurr1-NES2* y Nurr1-NES1/2* en células HEK293T transfectadas y posteriormente tratadas con arsenito sódico (100 μ M) o tratadas previamente con MG132 (40 μ M) durante 6 horas y posteriormente con arsenito sódico (100 μ M) durante 30 min y 60 min, y revelado contra la etiqueta V5. **F, G, H, e I**, Cuantificación densitométrica de los niveles de proteína, normalizada con los controles de carga β -actina (citósol) y lamina-B (núcleo) de A, B, C y D. Cada punto es la media \pm SD de n=3 muestras. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$ de los niveles proteicos nucleares de 30 min y 60 min comparados con el valor control. Las almohadillas muestran diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$ de los niveles proteicos citosólicos de 30 min y 60 min comparados con el valor control.

RESULTADOS



RESULTADOS

Nurr1 forma heterodímeros con el receptor X del ácido 9-*cis*-retinoico (RXR). En respuesta a estrés oxidativo se ha descrito que Nur77 forma también heterodímeros con RXR, que promueven su exporte nuclear (Cao X, *et al*, 2004). Por tanto, nuestro siguiente paso fue analizar si el exporte observado en Nurr1 por el tratamiento con arsenito sódico podría también estar relacionado con la formación de heterodímeros. Para ello, generamos un mutante de Nurr1 con varias mutaciones a alanina en los aminoácidos críticos de la secuencia *I-BOX* responsables de la heterodimerización (Fig. 10A y 10B). La distribución subcelular de este mutante se analizó mediante fraccionamiento subcelular en células HEK293T transfectadas con la versión salvaje de Nurr1 y la versión Nurr1-I-BOX* que no une el receptor RXR. Las células fueron tratadas posteriormente con arsenito sódico (100 μ M) durante 30 min y 60 min. Como se ilustra en la Fig.10C, el arsenito sódico indujo el exporte de la versión salvaje y del mutante Nurr1-I-BOX* a los tiempos estudiados, incrementando la cantidad de proteína en la fracción citosólica y decreciendo en la fracción nuclear con eficiencia similar. Este resultado indica que el receptor RXR no está involucrado en el exporte de Nurr1 por arsenito sódico, y sugiere que únicamente a la señal NES2 es responsable del exporte ante cambios en la homeostasis de oxido-reducción en la célula.

RESULTADOS

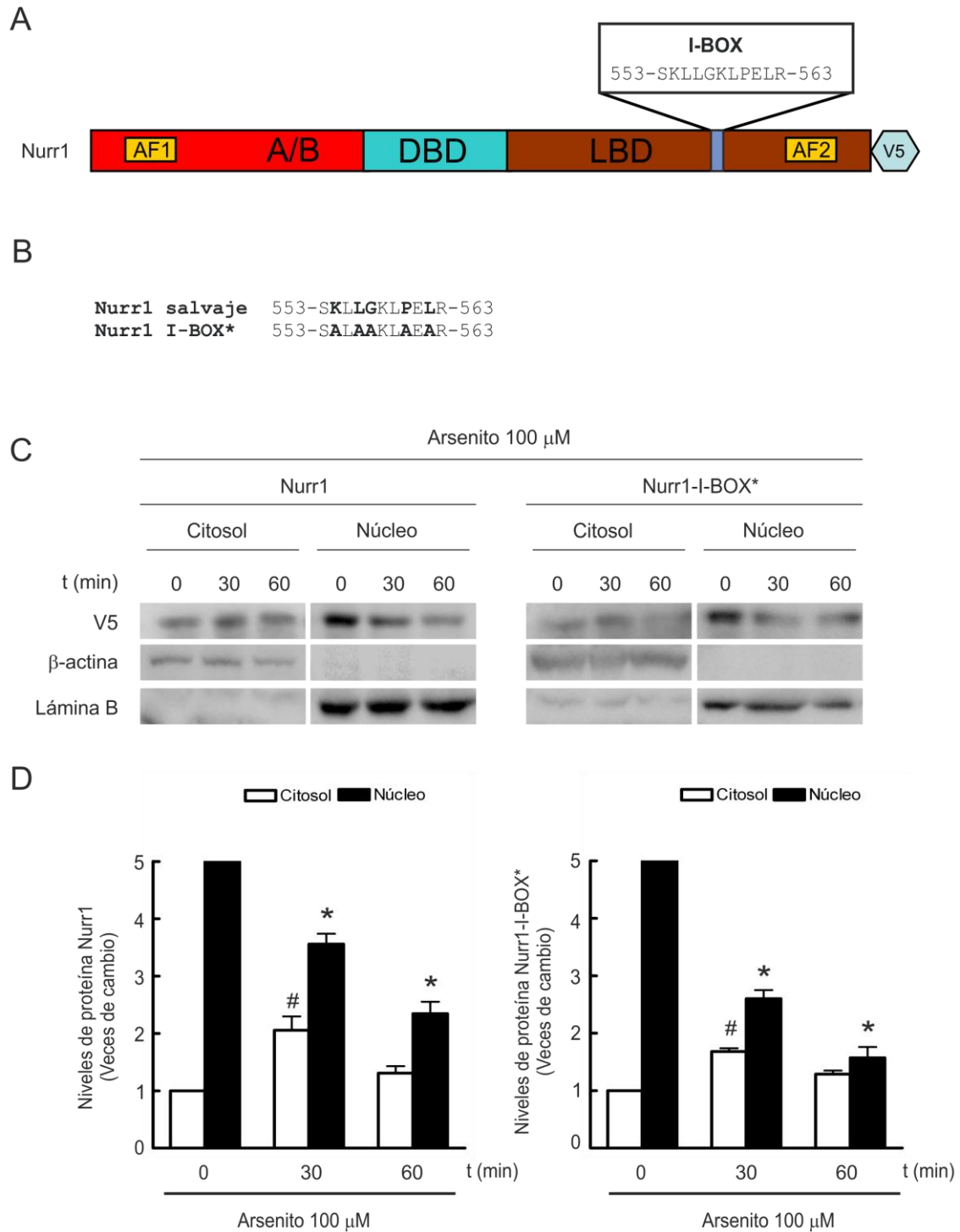


Figura 10. El receptor RXR no participa en el exporte de Nurr1 inducido por el arsenito sódico. **A** Estructura primaria de Nurr1 de ratón que representa la secuencia de aminoácidos entre 551-562 correspondiente a la secuencia I-BOX de unión al receptor RXR. **B**, Esquema del mutante Nurr1-I-BOXmut de unión al receptor RXR (las letras en negrita señalan los aminoácidos mutados en la secuencia original). **C**, Análisis de la distribución subcelular de Nurr1 salvaje, Nurr1-I-BOX* en células HEK293T transfectadas y posteriormente tratadas con arsenito sódico (100 μ M) durante 30 min y 60 min, y revelado contra la etiqueta V5. **D**, Cuantificación densitométrica de los niveles de proteína, normalizada con los controles de carga β -actina (citosol) y lamina-B (núcleo) de C. Cada punto es la media \pm SD de n=3 muestras. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$ de los niveles proteicos nucleares de 30 min y 60 min comparados con el valor control. Las almohadillas muestran diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$ de los niveles proteicos citosólicos de 30 min y 60 min comparados con el valor control.

2. REGULACIÓN DE NURR1 POR LA QUINASA GSK-3 β

2.1. El cloruro de litio estabiliza a Nurr1

Durante los últimos años han surgido evidencias que implican a la Ser/Thr proteína quinasa GSK-3 β en diversas patologías neurodegenerativas. Por tanto, en esta tesis doctoral nos propusimos determinar si la pérdida de Nurr1 podría estar relacionada con alteraciones en la regulación de GSK-3 β y si Nurr1 pudiese ser considerado como un nuevo sustrato de esta quinasa. Para determinar la posible relación de Nurr1 con GSK-3 β , tratamos células dopaminérgicas de ratón MN9D con el inhibidor de GSK-3 β cloruro de litio (LiCl, 50 mM), y con el inhibidor del proteasoma MG132 (40 μ M) como control (Fig. 11A). También utilizamos los mismos tratamientos en células HEK293T transfectadas con Nurr1 salvaje con una etiqueta V5 (Fig. 11B). En ambos experimentos observamos un incremento de los niveles de Nurr1, endógeno o ectópico, en presencia de cloruro de litio. La combinación de cloruro de litio y MG132 no indujo una acumulación mayor de Nurr1, sugiriendo que el MG132 satura la inhibición dependiente del proteasoma y que el cloruro de litio protege la degradación de Nurr1 de manera selectiva por esta vía.

2.2. GSK-3 β participa en la fosforilación de Nurr1

En vista del resultado anterior decidimos estudiar si el efecto de GSK-3 β sobre Nurr1 se debía a un cambio en su estado de fosforilación. Para ello, utilizamos células HEK293T co-transfectadas con la versión de Nurr1 salvaje, junto con dos versiones de GSK-3 β , una inactiva utilizada como control negativo, que lleva una mutación puntual de la Tyr 216 a Phe en el segmento de activación de la enzima que impide su fosforilación y mantiene la enzima en una conformación inactiva (GSK-3 β -Y216F), y una activa en la que se han deleccionado los primeros 9 aminoácidos del N-terminal que constituyen el pseudo-sustrato inhibidor donde reside la serina-9, que es fosforilable por la quinasa AKT y la inhibe, denominada GSK-3 β - Δ 9.

RESULTADOS

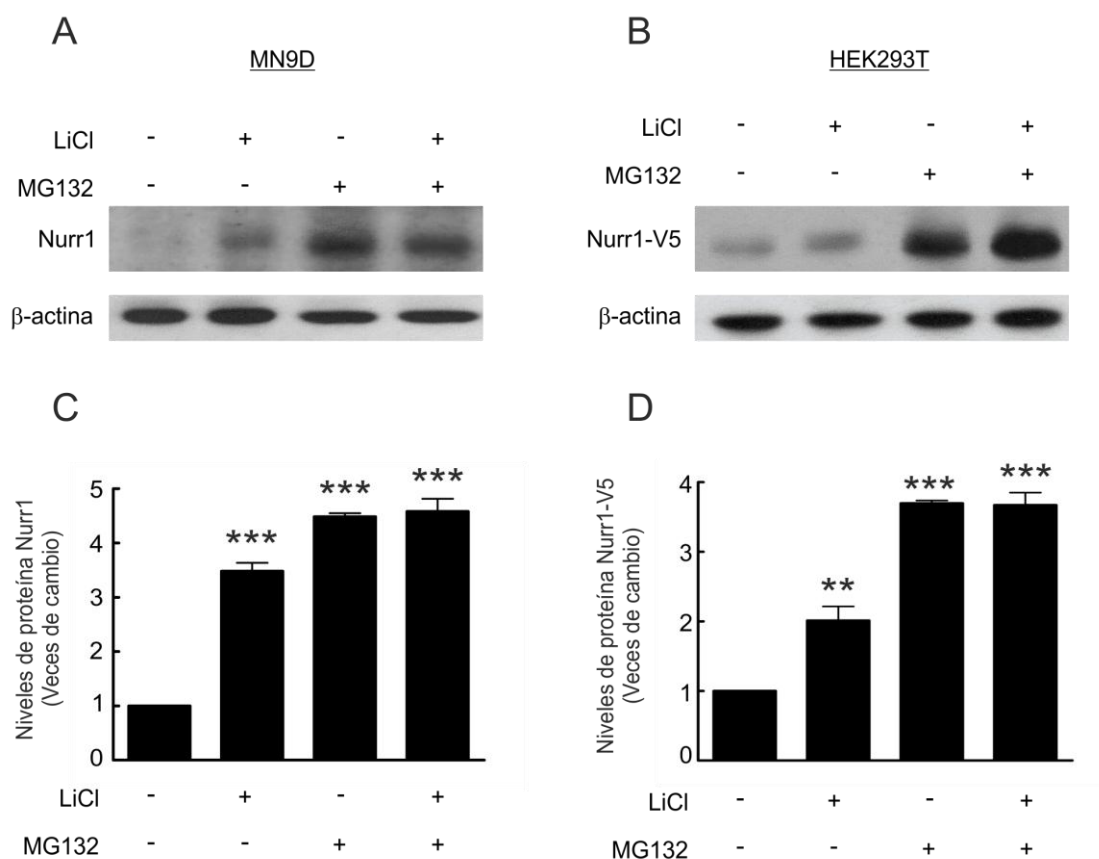


Figura 11. El cloruro de litio (LiCl) protege a Nurr1 de la degradación. **A y B**, Inmunoblot de células MN9D y HEK293T transfectadas con la versión de Nurr1 salvaje, tratadas con LiCl 50 mM y MG132 40 μ M durante 6 horas, reveladas con anti-Nurr1 y anti-V5. **C y D**, Cuantificación densitométrica de los niveles de proteína, normalizada con los controles de carga β -actina de A y B. Cada punto es la media \pm SD de n=3 muestras. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas con ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$, comparados con el control.

Posteriormente, las muestras fueron tratadas con fosfatasa λ (enzima que elimina fosfatos de residuos serina y treonina) y comparamos la movilidad de las bandas correspondientes a Nurr1 por SDS-PAGE (Fig. 12). Como se ilustra en la Fig. 12, la altura de la banda de Nurr1 que corresponde a la muestra co-transfectada con GSK-3 β - Δ 9 activa, se encuentra ligeramente retrasada (las flechas indican la localización de las bandas) con respecto a la banda donde co-transfectamos la versión GSK-3 β -Y216F inactiva. El tratamiento con fosfatasa λ provocó la pérdida de retraso electroforético de la banda correspondiente a la co-transfección con GSK-3 β - Δ 9. Estos resultados indican que la quinasa GSK-3 β interviene en la fosforilación de Nurr1, aunque desconocemos si lo hace de forma directa, englobando a Nurr1 como un

RESULTADOS

sustrato más de esta quinasa, o bien de forma indirecta a través de otra quinasa intermedia.

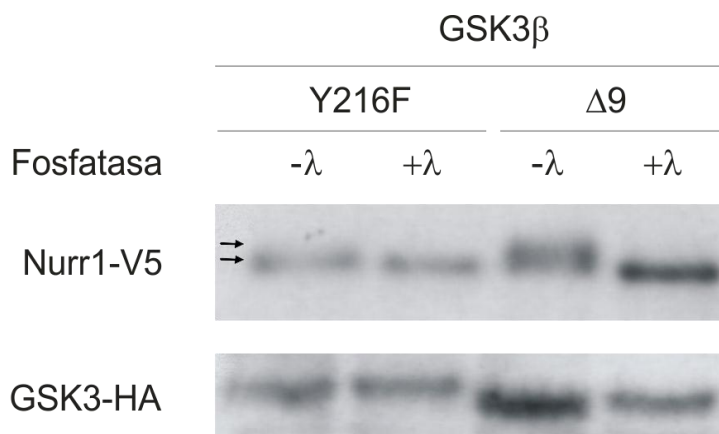


Figura 12. La quinasa GSK-3 β produce un retraso en la movilidad electroforética de Nurr1. Inmunoblot en células HEK293T co-transfectadas con la versión de Nurr1 salvaje junto con las dos versiones dominantes de GSK-3 β (dominante positivo GSK-3 β - $\Delta 9$ y dominante negativo GSK-3 β -Y216F). Las muestras fueron tratadas previamente con fosfatasa λ y revelado anti-V5 (Nurr1) y anti-HA (GSK-3 β). Las flechas indica el número de las bandas.

2.3. Identificación de la región de fosforilación de Nurr1 inducida por GSK-3 β .

A continuación buscamos la región de Nurr1 donde se estaría produciendo esa fosforilación que observamos en la Fig. 12. Un estudio *in silico* con el programa NesPhos 2.0 nos permitió predecir cuatro regiones ricas en serinas y treoninas (marcadas en negro Fig. 13A). Por otro lado localizamos una zona adicional rica en dichas serinas y treoninas, no detectada por el programa (Fig. 13A y Fig. 13B marcado en azul).

Con el fin de determinar cuáles de estas regiones podrían estar siendo fosforiladas por GSK-3 β , fabricamos mutantes de delección de cada una de ellas, empezando desde el extremo N-terminal (Fig. 14A). Para evitar posibles problemas de plegamiento o estabilidad que pudieran surgir en la proteína deleccionada, fusionamos estos fragmentos a la proteína EGFP. A continuación, co-transfectamos cada mutante de delección de Nurr1 en células HEK293T con las dos versiones inactiva y activa de GSK-3 β (GSK-3 β -Y216F y GSK-3 β - $\Delta 9$).

RESULTADOS

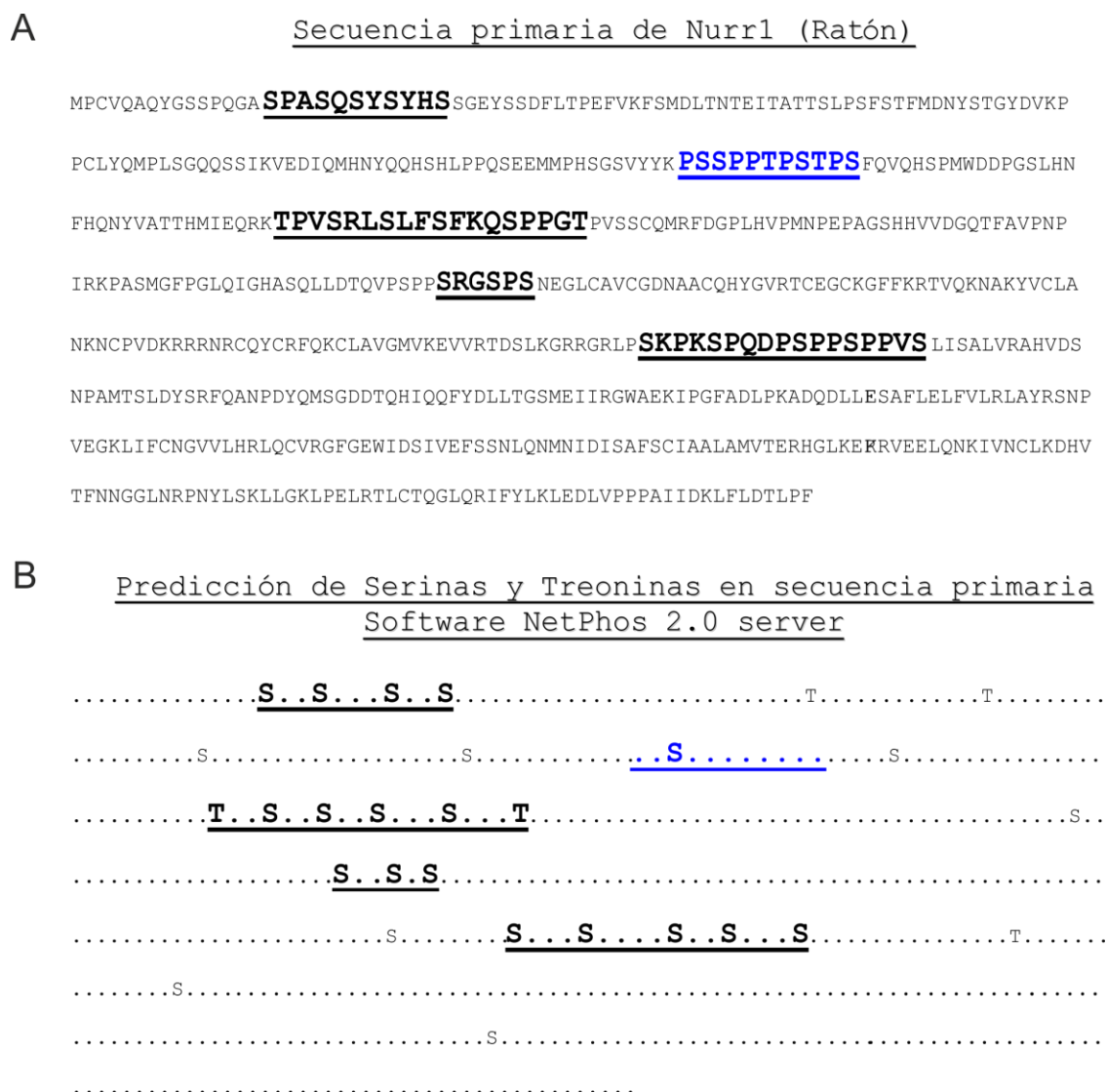


Figura 13. Predicción de aminoácidos candidatos a ser sustratos fosforilables por quinasas en la secuencia primaria en Nurrl de ratón. **A**, Secuencia primaria de la proteína Nurrl donde se localizan los “core” completos de serinas y treoninas. **B**, Predicción del software *NesPhos 2.0 server* sobre la secuencia primaria de la proteína Nurrl, destacando las serinas y treoninas candidatas a ser sustratos por quinasas.

RESULTADOS

Como se observa en la Fig. 14B, EGFP-Nurr1 salvaje y el primer mutante de delección EGFP-Nurr1 Δ Mut1 sufrieron un retraso de su movilidad electroforética en las calles correspondientes a la co-transfección con GSK-3 β - Δ 9 respecto a las transfectadas con GSK-3 β -Y216F. Por el contrario, a partir del segundo mutante de delección EGFP-Nurr1 Δ Mut2 hasta el último mutante EGFP-Nurr1 Δ Mut5, se igualó la altura de la bandas correspondiente a las calles co-transfectadas con las dos versiones dominantes de GSK-3 β . Como control de este experimento, y para descartar cambios en la movilidad electroforética que pudieran estar relacionados con fosforilación de EGFP, co-transfectamos la proteína EGFP con las dos versiones de GSK-3 β en células HEK293T (Fig. 14C). Observamos que no existe alteración apreciable en la movilidad de esta proteína. El conjunto de estos resultados demuestra que la región de Nurr1 que se fosforila por GSK-3 β se encuentra comprendida entre los aminoácidos 1-134.

En esta región existen dos regiones de serinas y treoninas candidatas para poder se fosforiladas. Dado que el retraso electroforético se pierde en el paso de EGFP-Nurr1 Δ Mut2 a EGFP-Nurr1 Δ Mut3 (Fig. 14A y 14B) concluimos que el mejor candidato para fosforilación por GSK-3 está en la segunda región (Fig. 13 marcado en azul).

RESULTADOS

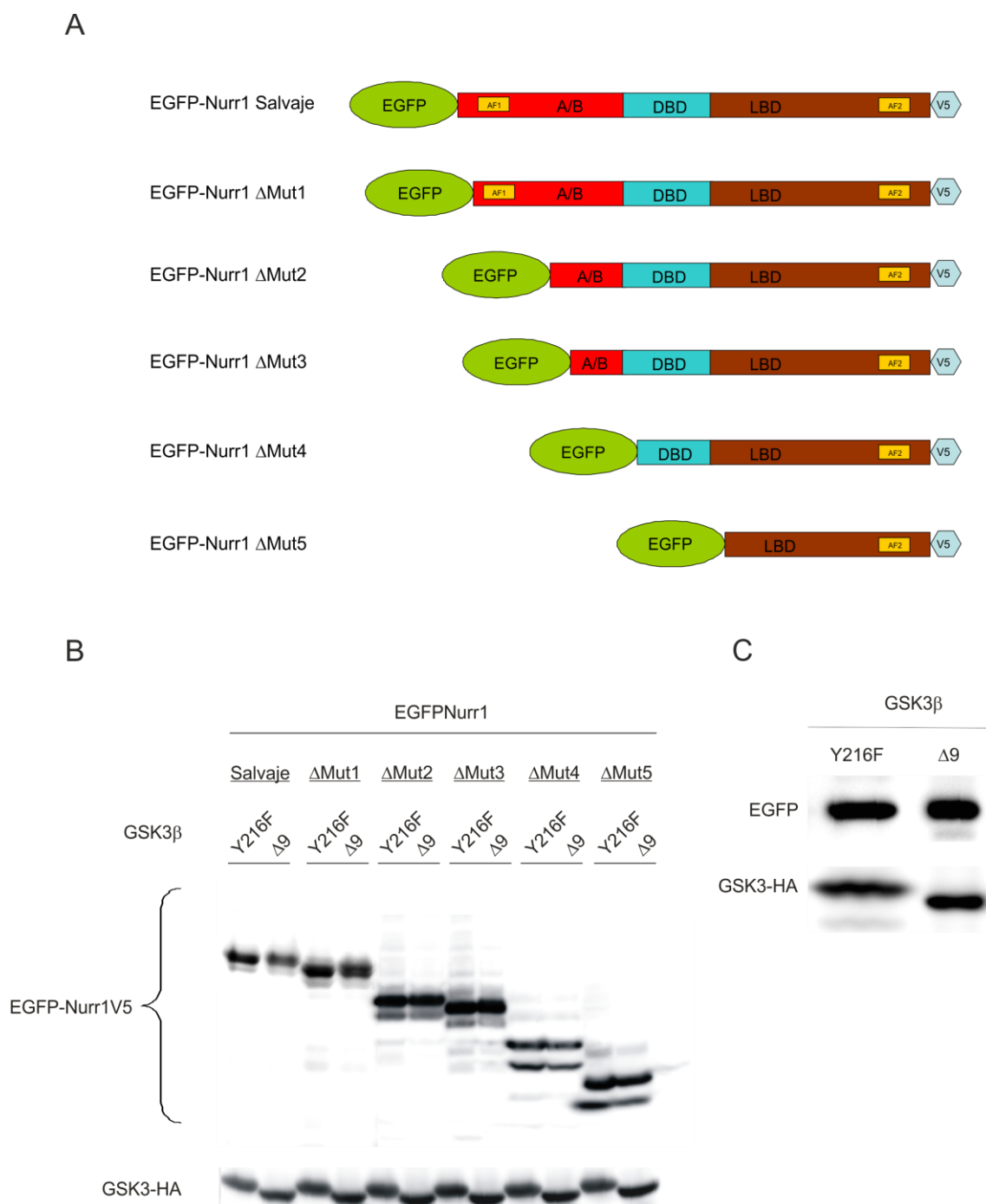


Figura 14. Identificación de la región fosforilable de Nurr1 en presencia de GSK-3 β . **A**, Esquema de la versión EGFP-Nurr1 salvaje y de los mutantes de delección EGFP-Nurr1 Δ Mut. **B**, Inmunoblot de células HEK293T co-transfectadas con la versión EGFP-Nurr1 salvaje y las versiones mutantes de delección EGFP-Nurr1 Δ Mut, con ambas versiones dominantes de GSK-3 β -Y216F y GSK-3 β - Δ 9, revelado anti-V5 (Nurr1) y anti-HA (GSK-3 β). **C**, Inmunoblot de células HEK293T co-transfectadas con EGFP y con ambas versiones dominantes de GSK-3 β -Y216F y GSK-3 β - Δ 9, revelado anti-GFP y anti-HA (GSK-3 β).

RESULTADOS

La secuencia que compone la segunda región ("Core" 2 en la Fig. 15A), se encuentra cercana a la región AF1 (dominio de transactivación, destinado a la regulación de la proteína). Esta secuencia está conservada en Nurr1 de vertebrados (Fig. 15B) y en otros miembros de la familia de receptores huérfanos (Fig. 15C). Realizamos mutagénesis puntual sobre las serinas y treoninas de esta zona por alanina (Fig. 16A).

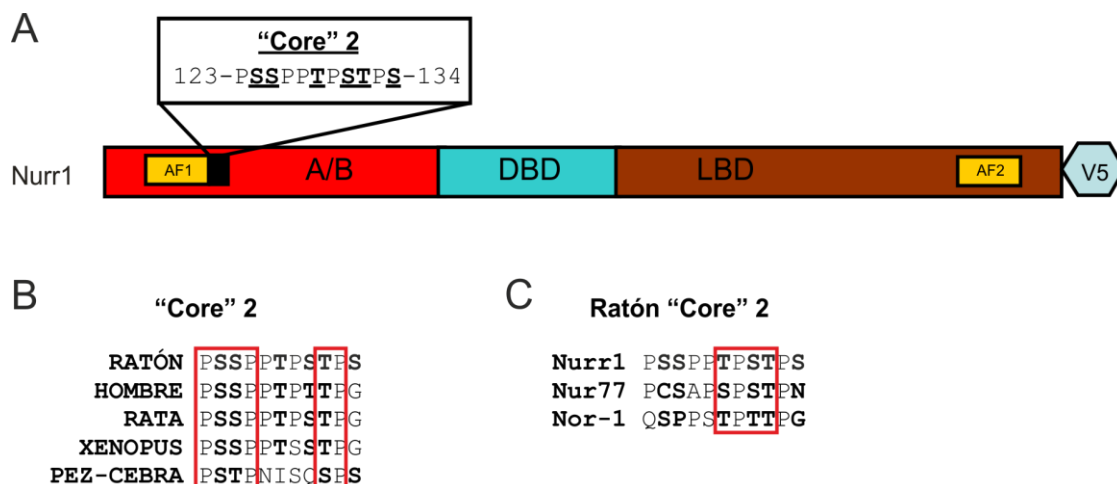


Figura 15. Análisis de la secuencia "core" 2 en Nurr1. **A**, Estructura primaria de Nurr1 de ratón que representa la secuencia de aminoácidos entre 123-134 correspondiente a la secuencia del "core" 2, identificada en la zona AF1 (región A/B) de la proteína. **B**, Conservación filogenética de la secuencia del "core" 2 de Nurr1 entre diferentes especies. **C**, Comparación de la secuencia del "core" 2 de Nurr1 con otros miembros de la familia de los receptores huérfanos. Los residuos señalados corresponden a los sitios que conforman las secuencias del "core" 2.

A continuación co-transfectamos en células HEK293T las versiones de Nurr1 salvaje y Nurr1-Mut2 con mutaciones puntuales que se muestran en la Fig. 16A y las versiones dominantes de GSK-3 β . Como se ilustra en la Fig. 16B, el mutante Nurr1-Mut2 co-transfectado con GSK-3 β - Δ 9 no presenta un retraso de su movilidad electroforética en comparación con Nurr1 salvaje. Estos resultados demuestran que el "core 2" de Nurr1 es la diana de fosforilación observada en presencia de la forma activa de GSK-3 β .

RESULTADOS

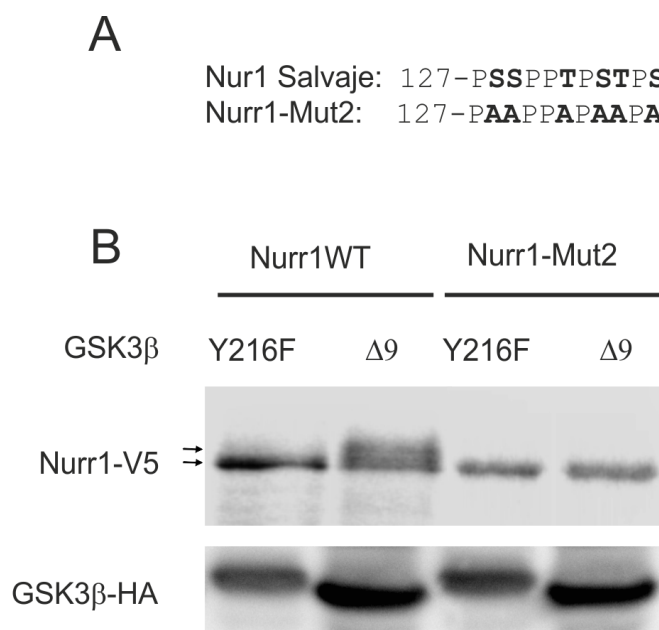


Figura 16. La mutación del “core” 2 elimina el retraso electroforético en presencia de GSK-3 β . **A**, Esquema del mutante Nurr1-Mut2 (las letras en negrita señalan los aminoácidos mutados en la secuencia original). **B**, Inmunoblot de células HEK293T co-transfectadas con la versión Nurr1 salvaje y el mutante del “core” 2 Nurr1-Mut2, junto con ambas versiones dominantes de GSK-3 β -Y216F y GSK-3 β - $\Delta 9$. Las flechas indica la localización de las bandas

2.4. La fosforilación inducida por GSK-3 β en la región “core” 2 no afecta a la estabilidad de Nurr1.

Como hemos descrito en el capítulo 2.1., el cloruro de litio aumenta los niveles basales de Nurr1 endógeno en células MN9D (Fig. 11A) y ectópico en HEK293T transfectadas (Fig. 11B), sugiriendo que GSK-3 β podría contribuir a su degradación. Por ello, decidimos utilizar el mutante Nurr1-Mut2 para comprobar si esta región era la responsable de la degradación mediada por GSK-3 β . Para ello, realizamos ensayos de vida media en células HEK293T co-transfectando la versión salvaje de Nurr1 (Fig. 17A) o la versión mutante Nurr1-Mut2 (Fig. 17B) con ambas versiones dominantes de GSK-3 β -Y216F y GSK-3 β - $\Delta 9$. Posteriormente las células se trataron con cicloheximida (100 μ M) y se lisaron al cabo de 30 min, 60 min, 120 min y 180 min. Como se ilustra en la Fig.17, la vida media de la versión Nurr1 salvaje (Fig. 17C) co-transfectada con GSK-3 β - $\Delta 9$ es más corta (aprox. 16 min) que la vida media co-transfectada con GSK-3 β -Y216F (aprox. 92 min), lo que nos permite corroborar que GSK-3 β

RESULTADOS

esta implicada en la degradación de Nurr1. Por otro lado, se observa que la vida media de la versión mutante Nurr1-Mut2 (Fig. 17D) co-transfectada con GSK-3 β - Δ 9 es parecida a la vida media de la versión Nurr1 salvaje (aprox. 15 min) comparada con la co-transfectada con GSK-3 β -Y216F (aprox. 83 min), lo que nos indica que la fosforilación que observamos en la región del “core” 2 no está implicada en la estabilidad de la proteína. Por tanto GSK-3 β induce una degradación de Nurr1 mediante un mecanismo que no implica a esta región.

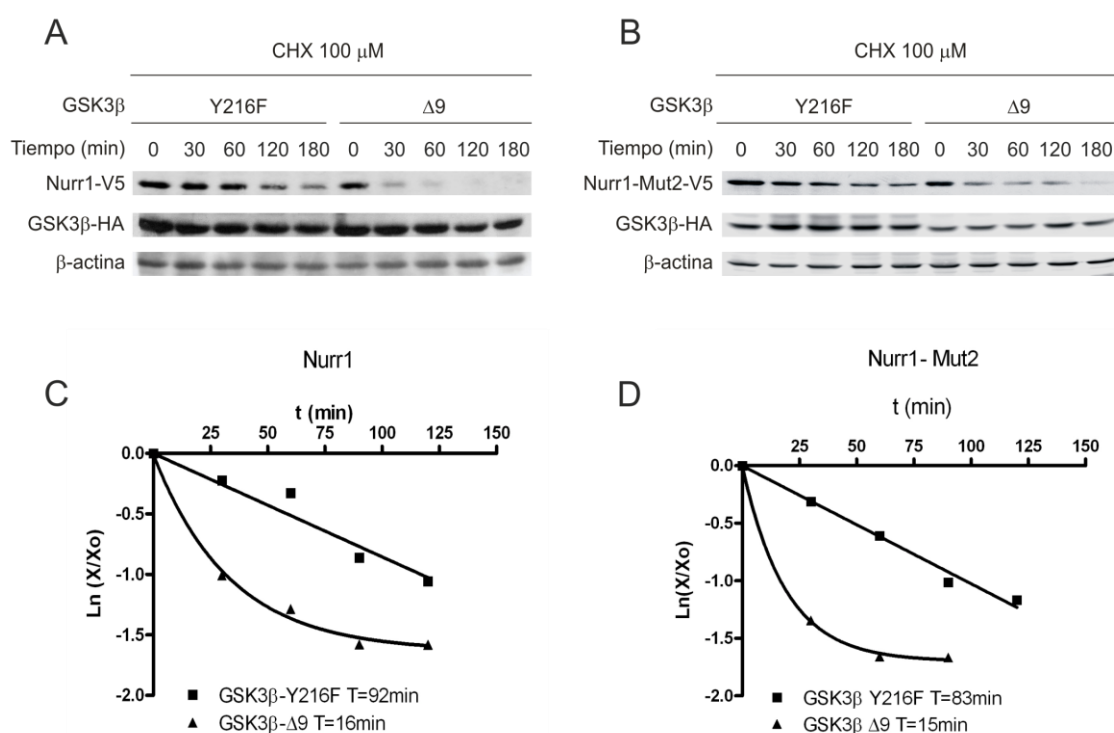


Figura 17. El “core” 2 de Nurr1 no está implicado en la estabilidad en presencia de GSK-3 β . **A** y **B**, Análisis de la estabilidad de la versión Nurr1 salvaje y del mutante Nurr1-Mut2 en células HEK293T co-transfectadas con ambas versiones dominantes de GSK-3 β -Y216F y GSK-3 β - Δ 9, tratando posteriormente con cicloheximida (100 μ M) y lisando a diferentes tiempos de 30 min, 60 min, 120 min y 180 min. **C** y **D**, Representación gráfica de la vida media de la versión de Nurr1 salvaje y la versión mutante Nurr1-Mut2 co-transfectado con la versión de GSK-3 β -Y216F (■) y con la versión de GSK-3 β - Δ 9 (▲), normalizadas con los niveles de β -actina.

2.5. GSK-3 β no regula la localización subcelular de Nurr1.

Se ha descrito que GSK-3 β fosforila algunos sustratos como Nrf2 y Snail para enviarlos al citoplasma, mediante mecanismos de exporte nuclear inducido por la exportina CRM1. Por otro lado y como hemos descrito anteriormente, Nurr1 posee señales NES que regulan su exporte por CRM1 y que responden a estrés oxidativo. Por estos dos motivos, estudiamos si el exporte de Nurr1 podría estar mediado por GSK-3 β . Para ello realizamos fraccionamientos subcelulares en células HEK293T co-transfectadas con la versión salvaje de Nurr1, junto con GSK-3 β -Y216F o GSK-3 β - Δ 9. Estas células se trataron con el inhibidor del proteasoma MG132 (40 μ M). Como se ilustra en la Fig. 18A, el tratamiento con MG132 aumentó la cantidad de Nurr1 basal en las células co-transfectadas con GSK-3 β - Δ 9, sin observarse un incremento en la fracción citosólica, respecto las células control donde co-transfectamos Nurr1 con la versión GSK-3 β -Y216F. Idéntico resultado se obtuvo mediante inmunofluorescencia (Fig. 18B), donde se observó que Nurr1 co-transfectado con GSK-3 β - Δ 9 se localizaba en el núcleo en presencia de MG132, al igual que el control co-transfectado con GSK-3 β -Y216F. Estos resultados sugieren que GSK-3 β no participa en el exporte de Nurr1.

RESULTADOS

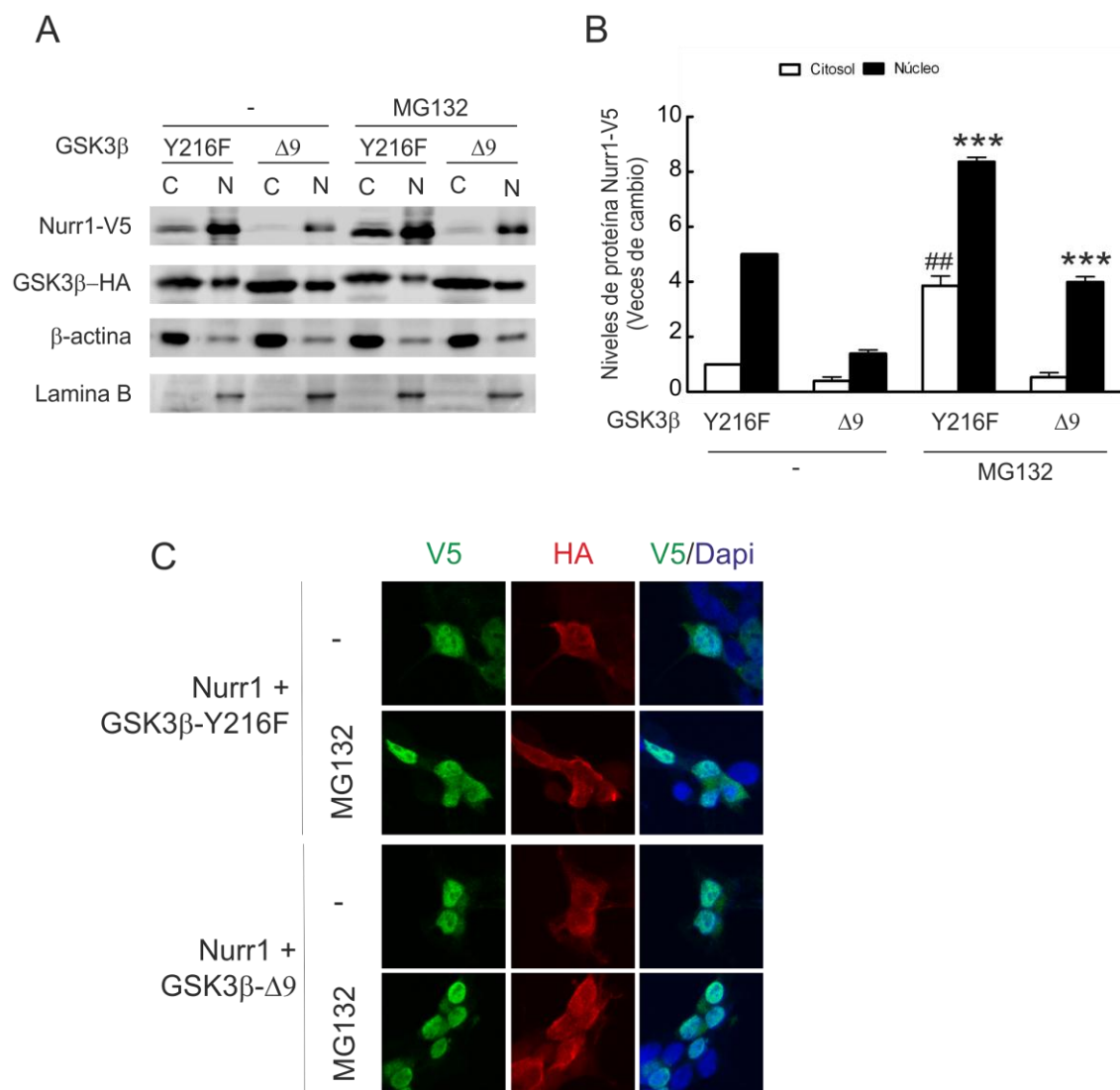


Figura 18. GSK-3β no induce el exporte de Nurr1. **A**, Análisis de la localización subcelular en células HEK293T co-transfectadas con la versión salvaje de Nurr1 y las versiones dominantes de GSK-3β-Y216F y GSK-3β-Δ9, tratadas posteriormente con MG132 (40 μM) durante 6 horas. **B**, Cuantificación densitométrica de los niveles de proteína, normalizada con los controles de carga β-actina (citósol) y lamina-B (núcleo) de A. Cada punto es la media ± SD de n=3 muestras. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas ***p<0.001 de los niveles proteicos nucleares tratados con MG132 comparados con los niveles proteicos sin MG132. Las almohadillas muestran diferencias estadísticamente significativas ##p<0.01 de los niveles proteicos citosólicos tratados con MG132 comparados con los niveles proteicos sin MG132. **C**, Análisis de la localización subcelular por inmunofluorescencia mostrando la distribución de Nurr1 salvaje en células HEK293T co-transfectadas con las versiones dominantes de GSK-3β-Y216F y GSK-3β-Δ9, tratadas posteriormente con MG132 (40 μM) durante 6 horas y revelada contra la etiqueta V5 (verde), con la etiqueta HA (rojo) y los núcleos teñidos con DAPI (azul).

DISCUSIÓN

1. NURR1 ES UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN QUE ESTA REGULADO POR CAMBIOS EN LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR.

En esta tesis doctoral hemos analizado en primer lugar la distribución subcelular de Nurr1 en varios modelos celulares. Tanto la proteína endógena expresada en células de origen neuronal, SH-SY5Y humanas y MN9D murinas, como la expresada ectópicamente mediante transfección en células HEK293T presentaron una localización principalmente nuclear y una fracción menor de Nurr1 citosólico. Esta distribución heterogénea de Nurr1 también se observa en líneas celulares de microglía (Fan *et al*, 2009). La distribución subcelular de Nurr1 es heterogénea y compleja. Concretamente en el Sistema Nervioso Central, Nurr1 aparece predominantemente en el núcleo celular en muchas regiones cerebrales como mesencéfalo (*Substantia nigra* y área tegmental ventral), áreas límbicas, cortex, hipocampo, etc., pero es predominantemente citoplasmático en una pequeña proporción de células del colículo superior y de la sustancia gris periacueductal (Ojeda *et al*, 2003). Este hecho sugiere que aunque Nurr1 no tiene un ligando fisiológico conocido, se estaría comportando como un receptor nuclear de tipo I, que se caracterizaría por mantenerse inactivo en el citoplasma esperando la llegada del ligando que promueva su translocación al núcleo. Aunque Nurr1 no tenga un ligando propio, se ha descrito su asociación con otro receptor nuclear de tipo I, que es el receptor de glucocorticoides (Carpentier *et al*, 2008). Por tanto, los cambios de localización subcelular observados estarían relacionados con estímulos específicos, y a tipos celulares concretos. En cualquier caso, nuestras observaciones en varios tipos celulares son consistentes con la distribución descrita en esos estudios y sugiere la existencia de un mecanismo del control del tráfico subcelular de Nurr1.

Con el fin de caracterizar los mecanismos implicados en el tráfico subcelular de Nurr1, analizamos su secuencia en busca señales de importe (NLS) y exporte nuclear (NES). Es previsible encontrar secuencias de importe nuclear en proteínas cuya función se desarrolle dentro del núcleo, como son por ejemplo los factores de transcripción, aunque existen excepciones como en el caso de la β -catenina (Fagotto *et al*, 1998). Esta proteína en su forma estable (GSK-3 β inactivo), se localiza en el núcleo en ausencia de señales NLS, ya que

su importe se realiza por unión directa al complejo del poro nuclear, al igual que la β -importina. En el caso de Nurr1, nosotros hemos identificado dos regiones NLS en la zona de unión al DNA (DBD). Existen muchas proteínas con un número variable de estas señales NLS, sin conocer muy bien el porque de esa variabilidad, aunque si se ha demostrado que todas ellas son funcionales. Una característica destacada en proteínas con más de una señal NLS, es que existe dependencia de una señal sobre la otra, denominándose señales NLS bipartitas (la mutación o alteración de una de ellas, provoca la inhibición de entrada de la proteína al núcleo), como ocurre en nuestro caso con Nurr1, o en otros descritos como es el caso de Nrf2 (Theodore *et al*, 2008). Pero también se ha descrito que estas señales no siempre siguen esta dependencia, como es el caso de la proteína LRH-1 (receptor homólogo de hígado 1), en el que la mutación de una de sus dos NLSs no altera la entrada de la proteína al núcleo (Yang *et al*, 2011).

Dependiendo del tipo celular donde se exprese Nurr1, la localización nuclear determina una función diferente de la proteína. En células dopaminérgicas, su localización nuclear conlleva la expresión de genes que controlan el metabolismo de la dopamina. (Jankovic *et al*, 2005). Así, se ha descrito que PARK7 (DJ-1) favorece la translocación de Nurr1 al núcleo, a través de la activación de la vía MAP quinasa ERK1/2 (Lu *et al*, 2012). Pero en células no dopaminérgicas, como son microglía o astrogliá su función cambia cuando se localiza en el núcleo, adoptando un papel controlador de la respuesta pro-inflamatoria. Así, la estimulación de la microglía con LPS, transloca a Nurr1 del citoplasma al núcleo donde ejerce una función anti-inflamatoria (Fan *et al*, 2009). Esta función consiste en unirse al factor de transcripción NF-kB-p65 y reclutar co-represores para inhibir la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Saijo *et al*, 2009). Por otra parte, la función de Nurr1 en el citoplasma permanece completamente desconocida a pesar de que como se ha comentado anteriormente ésta es su ubicación en algunas regiones cerebrales (Ojeda *et al*, 2003). En otros tejidos, existen evidencias del papel de Nurr1 en la progresión en el cáncer de vejiga (Inamoto *et al*, 2010), donde se observa que las células tumorales más invasivas son aquellas que presentan una tinción positiva de Nurr1 en el citoplasma. Sin embargo, al igual

que con las células del SNC, su función citosólica y el mecanismo que lleva a esta localización son todavía desconocidos.

En esta tesis doctoral también hemos observado la presencia de dos señales de exporte (NES) que participan en la exclusión nuclear de Nurr1. Este hecho nos llevó a preguntarnos qué señalización induciría el posible exporte de Nurr1 del núcleo. Hemos descrito que el estrés oxidativo provoca el exporte de Nurr1, e induce su degradación en el citoplasma vía proteasoma, aunque en circunstancias basales la degradación de Nurr1 es independiente de su localización subcelular (Fig. 1). La mutagénesis de la secuencia NES1 no anuló el exporte por el arsenito, al igual que la mutación de la secuencia *I-BOX* de unión al receptor RXR. En cambio, este efecto si fue sensible a la mutación de la secuencia NES2, involucrando este fenómeno exclusivamente a dicha señal de exporte y descartando la participación del receptor RXR.

Muchas proteínas responden a cambios de su localización subcelular en función del estado de oxido-reducción celular, como por ejemplo los factores de transcripción Nrf2 (Rojo *et al*, 2008) o incluso Nur77 (No *et al*, 2010). En estos casos el estrés oxidativo provoca la salida del núcleo y la degradación por el proteasoma. Con los resultados obtenidos, nosotros extendemos ahora estas observaciones a Nurr1. Este mecanismo de apagado de la función de Nurr1 podría darse en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la EP. Uno de los factores más característicos como causa idiopática de esta enfermedad es el estrés oxidativo provocado por el ambiente aerobio (Fahn and Sulzer, 2004; Benmoyal-Segal and Soreq, 2006), acrecentado además por el envejecimiento y por riesgos ambientales. Así, el estrés oxidativo contribuye a la cascada de eventos que conllevan la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Por otra parte, el mantenimiento del fenotipo dopaminérgico por activación de Nurr1 implica un mayor riesgo oxidativo. Esto es debido a que el anillo catecol de la dopamina se puede oxidar originando dopamina-quinona, altamente reactivo, que contribuye a dañar la neurona por incremento del estrés oxidativo (Sidell *et al*, 2001; Stokes *et al*, 1999). Esto hace que las neuronas dopaminérgicas estén sometidas a un nivel de estrés muy elevado que explica su mayor sensibilidad hacia agentes neurotóxicos que pueden

desbalancear la homeostasis redox (Chinta and Andersen, 2005). Por tanto, especulamos que ante un daño oxidativo la salida de Nurr1 al citosol y su posterior degradación, producirá el apagado en la expresión de genes implicados en la síntesis de dopamina y podría participar en un novedoso mecanismo de regulación del fenotipo dopaminérgico con el objetivo de adaptarse al estrés oxidativo.

La translocación de Nurr1 al citoplasma en respuesta al estrés oxidativo tendría otros efectos distintos sobre células que no sean dopaminérgicas como por ejemplo las células gliales, donde Nurr1 participa en la inhibición de la respuesta inflamatoria, a nivel de NF- κ B-p65. Debido a que las células microgliales también sufren daño oxidativo (Awada *et al*, 2012), estas podrían alterar su respuesta anti-inflamatoria, induciendo el exporte de Nurr1 al citoplasma, de tal forma que se liberaría y activaría NF- κ B-p65 induciendo la respuesta pro-inflamatoria.

Otra posible consecuencia del exporte de Nurr1 es la regulación de p53, ya que se ha descrito que Nurr1 secuestra a p53 inhibiendo así la apoptosis. En este sentido y ante un de daño por estrés oxidativo, donde la célula no puede mantener el equilibrio redox, el exporte de Nurr1 al citoplasma y la liberación de p53 activaría el programa genético de muerte celular programada. Desde este punto de vista, Nurr1 podría ser considerado como un proto-oncogen, ya que cualquier alteración en este mecanismo de exporte provocaría la inhibición de p53 de una manera más prolongada, conduciendo a la transformación celular.

Además, nosotros hemos identificado otra secuencia de exporte NES1 en la estructura primaria de Nurr1, completamente funcional y que responde a la exportina CRM1, aunque no participa en la regulación del tráfico subcelular por cambios en la homeostasis oxido-reducción. Desconocemos el mecanismo que provoca el exporte de Nurr1 a través de esta señal NES1 y por lo tanto, el posible papel que tendría Nurr1 en el citoplasma. Esta misma secuencia de exporte ha sido identificada en Nur77 donde se ha propuesto que en respuesta a NGF (Nerve Growth Factor) se produce la activación de la vía MAPquinasa ERK1/2, fosforilando a Nur77 y provocando el exporte del dímero Nur77/RXR al

citoplasma. Se ha propuesto que éste es un mecanismo de regulación para RXR (Katagiri *et al*, 2000). En principio, este mecanismo no podría darse en Nurr1, ya que la fosforilación de Nurr1 por ERK1/2 favorece su entrada en el núcleo (Lu *et al*, 2012; Fan *et al*, 2009), aunque no excluimos otras posibilidades.

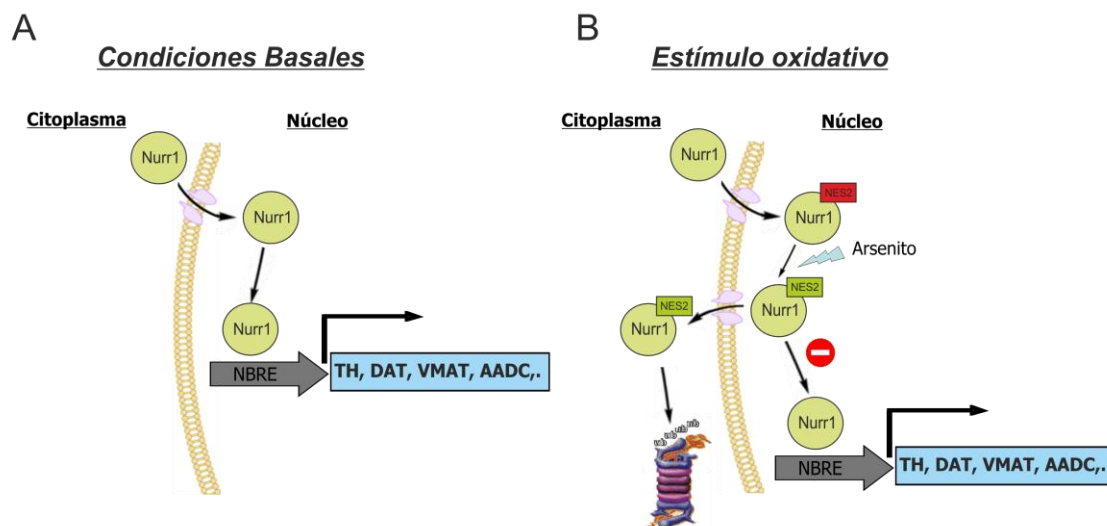


Figura 1. Representación esquemática del transporte de Nurr1 inducido por el arsenito sódico. **A**, Condiciones basales de entrada de Nurr1 al núcleo celular mediante la señal de importe bipartita localizada en su dominio DBD, para ejercer sus funciones como regulador de la expresión génica de los genes del metabolismo de la dopamina. **B**, Mecanismo de acción que ejerce el estrés oxidativo (arsenito sódico) sobre Nurr1, induciendo el transporte del núcleo al citoplasma a través de su señal NES2, para su posterior degradación vía proteasoma.

2. IDENTIFICACIÓN DE UN POSIBLE MECANISMO DE REGULACIÓN DE NURR1 A TRAVÉS DE LA QUINASA GSK-3 β Y SU IMPLICACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Varios estudios sugieren la participación de GSK-3 β en diversos procesos patológicos, entre los que se incluyen diversas enfermedades neurodegenerativas (Hsiung *et al*, 2003; Nagao *et al*, 2009). Esta quinasa está relacionada con la aparición y progresión de la enfermedad de Alzheimer, donde participa en la hiperfosforilación de la proteína asociada a microtúbulos *tau* y contribuye a la formación de los ovillos neurofibrilares característicos de esta enfermedad (Liu *et al*, 2002). Por otro lado, la participación de esta quinasa en la enfermedad de Parkinson es aún poco conocida. En esta tesis doctoral aportamos una nueva evidencia sobre la posible contribución que GSK-3 β puede tener en dicha enfermedad, ya que hemos observado que la inhibición de GSK-3 β con litio incrementa la estabilidad de Nurr1. Por otra parte, la forma constitutivamente activa de GSK-3 β contribuye a la desestabilización de Nurr1 y provoca un retraso de la movilidad electroforética, asociada a la fosforilación en la región N-terminal de la proteína (Fig. 2). Desconocemos si esta fosforilación está directamente mediada por GSK-3 β y el posible papel que tendría en la función de Nurr1, ya que la utilización del mutante de Nurr1 que es insensible a esta fosforilación no altera su estabilidad ni su localización subcelular. Una posible función de la fosforilación por GSK-3 β podría ser la de modular la interacción de Nurr1 con otras proteínas, como el receptor de glucocorticoides, p53, p65 o con el receptor RXR. La regulación de la interacción proteína-proteína ya ha sido descrita para otros sustratos de esta quinasa, como es la inhibición de la asociación de los microtúbulos por fosforilación de la proteína MAP2C (proteína 2C asociada a microtúbulos) (Sánchez *et al*, 2000) o la regulación de NF- κ B-p65, donde la fosforilación por GSK-3 β permite la asociación de p65 con Nurr1 produciendo su inhibición (Saijo *et al*, 2009). Además, la región estudiada, cercana a la zona de transactivación AF1 que hemos denominado “core” 2 de fosforilación, es también diana de otro grupo de quinasas como son las MAP quinasas ERK1/2, que fosforilan la Ser126, Thr129 y Thr132 y son responsables del control transcripcional y la localización nuclear de Nurr1 (Zhang *et al*, 2007). GSK-3 β

también está provocando un cambio en el estado de fosforilación de Nurr1 en esta misma región, aunque desconocemos los residuos exactos en los que se está produciendo. Independientemente de que GSK-3 β fuese la responsable directa de la fosforilación observada en Nurr1, el hecho de que se este produciendo esta modificación post-traducciona en la misma región o incluso es los mismos residuos fosforilados por ERK1/2 determinaría un mecanismo de regulación muy complejo en Nurr1. Aunque este efecto parezca improbable, no es un mecanismo novedoso, ya que han sido descritas dos quinasas independientes que realizan una fosforilación en Nurr1 utilizando el mismo residuo de Ser346 localizada en el dominio de unión a DNA. Estas quinasas son Akt, que está implicada en la regulación de la estabilidad de Nurr1 (Jo *et al*, 2009) y RSK (quinasa S6 ribosómica), que regula la unión al DNA del receptor nuclear huérfano Nur77 y a la proteína 14-3-3 *in vitro* (Wingate *et al*, 2006).

En relación con la regulación de la estabilidad de Nurr1 por GSK-3 β , hemos descrito inicialmente que la degradación de Nurr1 mediada por esta quinasa es principalmente nuclear (Fig. 2). Este hecho confirma que el mecanismo de degradación de Nurr1 no se realiza exclusivamente en un compartimento celular fijo, sino que es variable entre núcleo y citoplasma como hemos descrito en esta tesis doctoral. Por tanto, en la EP un cambio en la homeostasis redox de las neuronas dopaminérgicas provocaría tanto el transporte de Nurr1 al citoplasma, como la activación de GSK-3 β , desencadenando la degradación de Nurr1. Esto implicaría la existencia de un mecanismo de degradación adicional de formas de Nurr1 nucleares, combinado con una degradación citosólica por transporte de Nurr1 ante una situación de estrés oxidativo. De esta manera, la neurona dopaminérgica reduciría la expresión de genes implicados en el metabolismo de la dopamina, hasta que pudiese recuperar la homeostasis redox. Por otro lado, alteraciones en la actividad de la quinasa o mutaciones constitutivamente activas de GSK-3 β (Kwok *et al*, 2005), podrían provocar una disminución anómala de Nurr1, pudiendo desencadenar el inicio de un proceso patológico por pérdida del fenotipo dopaminérgico en neuronas nigrostriatales.

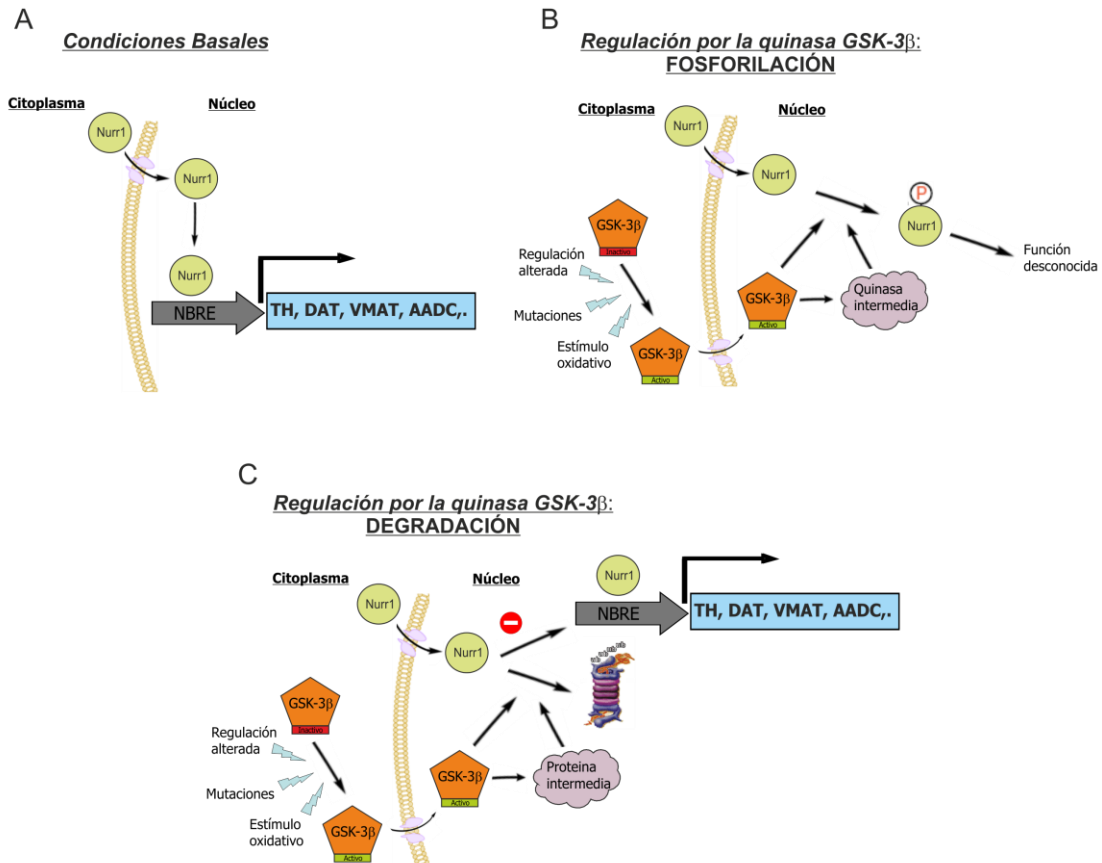


Figura 2. Representación esquemática de la regulación ejercida por GSK-3 β sobre Nurr1. **A**, Condiciones basales de entrada de Nurr1 al núcleo celular mediante la señal de importe bipartita localizada en su dominio DBD, para ejercer sus funciones como regulador de la expresión génica de los genes del metabolismo de la dopamina. **B**, Mecanismo que implica la fosforilación de Nurr1 en el núcleo por GSK-3 β o bien a través de alguna otra quinasa intermedia. **C**, Mecanismo que implica la degradación de Nurr1 en el núcleo por GSK-3 β o bien a través de alguna otra proteína intermedia.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se han obtenido en esta Tesis Doctoral han sido las siguientes:

1. Estudio del control de la localización subcelular de Nurr1.

1.1 Nurr1 tiene una localización preferentemente nuclear en modelos celulares dopaminérgicos y modelos ectópicos, con una pequeña proporción citosólica.

1.2 Nurr1 tiene una secuencia de localización nuclear bipartita (NLS). Ambas señales son necesarias para localizar a Nurr1 en el núcleo celular, aunque la señal NLS2 es suficientemente potente para poder actuar por sí misma.

1.3 Nurr1 tiene dos señales de exporte nuclear (NES) que responden a CRM1 y cuya secuencia se encuentra muy conservada.

1.4 En ausencia de estímulos, la estabilidad de Nurr1 no depende de su localización subcelular.

1.5 El estrés oxidativo regula la localización subcelular, exportando a Nurr1 al citoplasma a través de la señal de exporte NES2 e induciendo su degradación.

2. Regulación de Nurr1 por la quinasa GSK-3 β .

2.1 La quinasa GSK-3 β contribuye a la degradación de Nurr1.

2.2 Nurr1 es fosforilado en presencia de formas de GSK-3 β activas.

2.3 La región “core” 2 de fosforilación por GSK-3 β en Nurr1 no contribuye a cambios en su estabilidad ni en su localización subcelular.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aarnisalo P, Kim CH, Lee JW, Perlmann T. "Defining requirements for heterodimerization between the retinoid X receptor and the orphan nuclear receptor Nurr1". (2002). *J Biol Chem.*277(38):35118-23
- Awada R, Rondeau P, Grès S, Saulnier-Blache JS, Lefebvre d'Hellencourt C, Bourdon E. "Autotaxin protects microglial cells against oxidative stress". (2012). *Free Radic Biol Med.*; 52(2):516-26.
- Bannon, M.J., Pruetz, B., Manning-Bog, A.B., Whitty, C.J., Michelhaugh, S.K., Sacchetti, P., Granneman, J.G., Mash, D.C., Schmidt, C.J., Decreased expression of the transcription factor NURR1 in dopamine neurons of cocaine abusers. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 6382–6385.
- Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC, Rainey WE. "The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production". (2004). *Mol Endocrinol.*; 18(2):279-90.
- Benmoyal-Segal L, Soreq H. "Gene-environment interactions in sporadic Parkinson's disease". (2006). *J. Neurochem.* ;97(6):1740-55.
- Bensinger SJ, Tontonoz P. "A Nurr1 pathway for neuroprotection". (2009). *Cell.*; 137(1):26-8.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS (1978). "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones". *Cancer Res.* 38 (11 Pt 1); 3751–7
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. "Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease". *Prog Neurobiol.* (2001); 65(2):135-72. Review.
- Boldingh Debernard KA, Mathisen GH, Paulsen RE. "Differences in NGFI-B, Nurr1, and NOR-1 expression and nucleocytoplasmic translocation in glutamate-treated neurons". (2012). *Neurochem Int.* Epub ahead of print]
- Buervenich, S., Carmine, A., Arvidsson, M., Xiang, F., Zhang, Z., Sydow, O., Jonsson, E.G., Sedvall, G.C., Leonard, S., Ross, R.G., Freedman, R., Chowdari, K.V., Nimgaonkar, V.L., Perlmann, T., Anvret, M., Olson, L., 2000. NURR1 mutations in cases of schizophrenia and manic-depressive disorder. *Am. J. Med. Genet.* 96, 808–813.
- Cao X, Liu W, Lin F, Li H, Kolluri SK, Lin B, Han YH, Dawson MI, Zhang XK. "Retinoid X receptor regulates Nur77/TR3-dependent apoptosis [corrected] by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting". (2004). *Mol Cell Biol.*; 24(22):9705-25.
- Carpentier R, Sacchetti P, Ségard P, Staels B, Lefebvre P., "The glucocorticoid receptor is a co-regulator of the orphan nuclear receptor Nurr1" (2008). *Journal of Neurochemistry* 104; 777-789.
- Castro DS, Arvidsson M, Bondesson Bolin M, Perlmann T., "Activity of the Nurr1 Carboxyl-terminal Domain Depends on Cell Type and Integrity of the Activation Function 2" (1999). *The journal of Biological Chemistry* 274; 37483-37490.
- Chen G, Bower KA, Ma C, Fang S, Thiele CJ, Luo J. "Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death". (2004). *FASEB J.*; 18(10):1162-4.
- Chinta SJ, Andersen JK. "Dopaminergic neurons". (2005). *Int J Biochem Cell Biol.*; 37(5):942-6. Epub 2004 Dec 2. Review.

- Choi HK, Won LA, Kontur PJ, Hammond DN, Fox AP, Wainer BH, Hoffmann PC, Heller A (1991). "Immortalization of embryonic mesencephalic dopaminergic neurons by somatic cell fusion." *Brain Res*; 552(1); 67-76.
- Chu Y, Le W, Kompoliti K, Jankovic J, Mufson EJ, Kordower JH., "Nurr1 in Parkinson's Disease and Related Disorders" (2006). *The Journal of Comparative Neurology* 494; 495-514.
- Cohen P, Frame S. "The renaissance of GSK3". (2001). *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 2(10):769-76.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B". (1995). *Nature* 378, 785–789.
- DeYoung RA, Baker JC, Cado D, Winoto A. "The orphan steroid receptor Nur77 family member Nor-1 is essential for early mouse embryogenesis" (2003). *J Biol Chem.*; 278(47):47104-9.
- Du JX, Bialkowska AB, McConnell BB, Yang VW. "SUMOylation regulates nuclear localization of Krüppel-like factor 5". (2008). *J Biol Chem.*; 283(46):31991-2002.
- Dubois C, Hengerer B, Mattes H. "Identification of a potent agonist of the orphan nuclear receptor Nurr1". (2006). *ChemMedChem.*; 1(9):955-8. Review
- E. Avraham, R. Szargel, A. Eyal, R. Rott, S. Engelender. "Glycogen synthase kinase 3 β modulates synphilin-1 ubiquitylation and cellular inclusion formation by SIAH. Implication for proteasomal function and Lewy body formation". (2005). *J. Biol. Chem.* 280: 42877–42886.
- Fagotto F, Glück U, Gumbiner BM. "Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin". (1998). *Curr Biol.*; 8(4):181-90
- Fahn S, Sulzer D. "Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease". (2004). *NeuroRx.*; 1(1):139-54.
- Fan X, Luo G, Ming M, Pu P, Li L, Yang D, Le W., "Nurr1 expression and its modulation in microglia" (2009). *Neuroimmunomodulation* 16(3); 162-1701.
- Gai WP, Yuan HX, Li XQ, Power JT, Blumbergs PC, Jensen PH. "In situ and in vitro study of colocalization and segregation of alpha-synuclein, ubiquitin, and lipids in Lewy bodies". (2000). *Exp Neurol.*; 166(2):324-33.
- Galleguillos D., Vecchiola A., Fuentealba J. A., Ojeda V., Alvarez K., Gómez A., and Andrés M. E. "PIAS γ Represses the Transcriptional Activation Induced by the Nuclear Receptor Nurr1". (2003). *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (3): 2005–2011.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5". *J. Gen. Virol.* 36 (1); 59–74
- Grimes DA, Han F, Panisset M, Racacho L, Xiao F, Zou R, Westaff K, Bulman DE., "Translated Mutation in the Nurr1 Gene as a Cause for Parkinson's Disease" (2006). *Movement Disorders* 21; 906-909.
- Holla VR, Mann JR, Shi Q, DuBois RN. "Prostaglandin E2 regulates the nuclear receptor NR4A2 in colorectal cancer". (2006). *J Biol Chem*; 281(5):2676-82.
- Hsiung SC, Adlersberg M, Arango V, Mann JJ, Tamir H, Liu KP. "Attenuated 5-HT1A receptor signaling in brains of suicide victims: involvement of

- adenylyl cyclase, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt and mitogen-activated protein kinase". (2003). *J Neurochem* 87: 182–194.
- Inamoto T, Czerniak BA, Dinney CP, Kamat AM. "Cytoplasmic mislocalization of the orphan nuclear receptor Nurr1 is a prognostic factor in bladder cancer". (2010). *Cancer*; 116(2):340-6.
- Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan KL. "TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK-3 β to regulate cell growth". (2006). *Cell* 126: 955–968.
- Jacobsen KX, MacDonald H, Lemonde S, Daigle M, Grimes DA, Bulman DE, Albert PR., "A Nurr1 point mutant, implicated in Parkinson's disease, uncouples ERK1/2-dependent regulation of tyrosine hydroxylase transcription" (2008). *Neurobiology of Disease* 29; 117-122.
- Jankovic J, Chen S, Le WD., "The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease". (2005). *Progress in Neurobiology* 77; 128-138.
- Jankovic "Progression of Parkinson's disease: progress in charting the course". (2005). *Arch. Neurol.* 62, 351–352.
- Jans DA, Hübner S. "Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation". (1996). *Physiol Rev.*;76(3):651-85.
- Jo AY, Kim MY, Lee HS, Rhee YH, Lee JE, Baek KH, Park CH, Koh HC, Shin I, Lee YS, Lee SH., "Generation of Dopamine Neurons With Improved Cell Survival And Phenotype Maintenance Using A Degradation Resistant Nurr1 Mutant" (2009). *Stem Cells* Epub ahead of print.
- Katagiri Y, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Ozato K, Guroff G. "Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B". (2000). *Nat Cell Biol.*; 2(7):435-40.
- Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H., "Nuclear Export Signal Consensus Sequences Defined Using a Localization-Based Yeast Selection System" (2008). *Traffic* 9; 2053–2062.
- Kozikowski AP, Gaisina IN, Petukhov PA, Sridhar J, King LT, Blond SY, Duka T, Rusnak M, Sidhu A. "Highly potent and specific GSK-3 β inhibitors that block tau phosphorylation and decrease alpha-synuclein protein expression in a cellular model of Parkinson's disease". (2006). *Chem. Med. Chem.* 1: 256–266.
- Kutay U, Güttinger S. "Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak". (2005). *Trends Cell Biol.*; 15(3):121-4.
- Kwok JB, Hallupp M, Loy CT, Chan DK, Woo J, Mellick GD, Buchanan DD, Silburn PA, Halliday GM, Schofield PR. "GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease". (2005). *Ann Neurol.*; 58(6):829-39.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227(5259); 680-685.
- Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH. "Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha". (2007). *J Biol Chem.*; 282(8):5101-5.
- Law S. W., Conneely O.M., DeMayo F.J., O'Malley B.W. (1992). "Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1". *Mol Endocrinol* 6(12); 2129-35.

- Le W, Conneely OM, He Y, Jankovic J, Appel SH., "Reduced Nurr1 Expression Increases the Vulnerability of Mesencephalic Dopamine Neurons to MPTP-Induced Injury". (1999). *Journal of Neurochemistry*. **73**, 2218-2221.
- Le W, Pan T, Huang M, Xu P, Xie W, Zhu W, Zhang X, Deng H, Jankovic J. "Decreased NURR1 gene expression in patients with Parkinson's disease". (2008). *J Neurol Sci.*; 273(1-2):29-33.
- Le, W.D., Xu, P., Jankovic, Jiang, H., Appel, S.H., Smith, R.G., Vassilatis, D.K., (2003). "Mutation in NR4A2 associated with familial Parkinson disease". *Nat. Genet.* 33, 85–89.
- Lee KW, Cobb LJ, Paharkova-Vatchkova V, Liu B, Milbrandt J, Cohen P. "Contribution of the orphan nuclear receptor Nur77 to the apoptotic action of IGFBP-3". (2007). *Carcinogenesis*; 28(8):1653-8.
- Lee SL, Wesselschmidt RL, Linette GP, Kanagawa O, Russell JH, Milbrandt J. "Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77)". (1995). *Science.*; 269(5223):532-5.
- Li QJ, Tang YM, Liu J, Zhou DY, Li XP, Xiao SH, Jian DX, Xing YG. "Treatment of Parkinson disease with C17.2 neural stem cells overexpressing NURR1 with a recombined replicon-deficient adenovirus containing the NURR1 gene". (2007). *Synapse.* ;61(12):971-7.
- Li X, Tai HH. "Activation of thromboxane A(2) receptors induces orphan nuclear receptor Nurr1 expression and stimulates cell proliferation in human lung cancer cells". (2009) *Carcinogenesis*; 30(9):1606-13.
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. "Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk5 and GSK-3 β ". (2002). *FEBS Lett.*; 530(1-3):209-14.
- Lu L, Sun X, Liu Y, Zhao H, Zhao S, Yang H. "DJ-1 upregulates tyrosine hydroxylase gene expression by activating its transcriptional factor Nurr1 via the ERK1/2 pathway". (2012) *Int J Biochem Cell Biol.*; 44(1):65-71.
- Mages, H.W., Rilke, O., Bravo, R., Senger, G., Kroczeck, R.A., (1994). "NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroidhormone receptor NAK1/TR3". *Mol. Endocrinol.* 8; 1583–1591.
- Martinez-Gonzalez, J., Badimon, L.,(2005). "The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells". *Cardiovas. Res.* 65; 609–618.
- Maxwell MA, Muscat GE. "The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles". (2006). *Nucl Recept Signal.*; 4:e002. Epub 2006 Feb 8.
- Minc, E., de Coppet, P., Masson, P., Thiery, L., Dutertre, S., Amor-Gueret, M., and Jaulin, C. (1999) "The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites." *J. Biol. Chem.* 274; 503-509
- Morisco C, Seta K, Hardt SE, Lee Y, Vatner SF, Sadoshima J. "Glycogen synthase kinase 3 β regulates GATA4 in cardiac myocytes". (2001). *J Biol Chem* 276: 28586–28597.
- Moroianu J. "Nuclear import and export pathways". (1999). *J Cell Biochem.*;Suppl 32-33:76-83. Review
- Nagao M, Hayashi H. "Glycogen synthase kinase-3 β is associated with Parkinson's disease". (2009). *Neurosci Lett.*; 449(2):103-7.

- No H, Bang Y, Lim J, Kim SS, Choi HS, Choi HJ. "Involvement of induction and mitochondrial targeting of orphan nuclear receptor Nur77 in 6-OHDA-induced SH-SY5Y cell death". (2010). *Neurochem Int.*; 56(4):620-6.
- Nordzell M, Aarnisalo P, Benoit G, Castro DS, Perlmann T., "Defining an N-terminal activation domain of the orphan nuclear receptor Nurr1". (2004). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313, 205-211.
- Ojeda V, Fuentealba JA, Galleguillos D, Andrés ME. "Rapid increase of Nurr1 expression in the substantia nigra after 6-hydroxydopamine lesion in the striatum of the rat". (2003). *J Neurosci Res.*; 73(5):686-97
- Pan T, Zhu W, Zhao H, Deng H, Xie W, Jankovic J, Le W. "Nurr1 deficiency predisposes to lactacystin-induced dopaminergic neuron injury in vitro and in vivo". (2008). *Brain Res* 1222:222-9.
- Patel VP, Chu CT. "Nuclear transport, oxidative stress, and neurodegeneration". (2011). *Int J Clin Exp Pathol.*;4(3):215-29.
- Pearen MA, Muscat GE. "Nuclear hormone receptor 4A signaling: implications for metabolic disease". (2010). *Mol Endocrinol.*; 24(10):1891-903. Review.
- Perlmann T, Wallén-Mackenzie A., "Nurr1, an orphan nuclear receptor with essential functions in developing dopamine cells". (2004). *Cell Tissue Res.*, 318, 45-52.
- Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J. "Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells". (1997). *Mol Cell Biol.*; 17(10):5946-51.
- Pirih FQ, Tang A, Ozkurt IC, Nervina JM, Tetradis S. "Nuclear orphan receptor Nurr1 directly transactivates the osteocalcin gene in osteoblasts". (2004). *J Biol Chem.*; 279(51):53167-74..
- Rada P, Rojo AI, Chowdhry S, McMahon M, Hayes JD, Cuadrado A. "SCF/{beta}-TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner". (2011). *Mol Cell Biol.*; 31(6):1121-33
- Rayasam G. V., Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A. "Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake". (2009). *Br J Pharmacol.*; 156(6):885-98
- Robertson LA, Kim AJ, Werstuck GH. "Mechanisms linking diabetes mellitus to the development of atherosclerosis: a role for endoplasmic reticulum stress and glycogen synthase kinase-3". (2006). *Can J Physiol Pharmacol* 84: 39-48.
- Rojo AI, Sagarra MR, Cuadrado A. "GSK-3beta down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress". (2008). *J Neurochem.*; 105(1):192-202.
- Sacchetti P, Carpentier R, Ségard P, Olivé-Cren C, Lefebvre P., "Multiple signaling pathways regulate the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NURR1". (2006). *Nucleic Acids Research*. 34, 5545-5527.
- Sacchetti P, Dwornik H, Formstecher P, Rachez C, Lefebvre P. "Requirements for heterodimerization between the orphan nuclear receptor Nurr1 and retinoid X receptors". (2002). *J Biol Chem*. 277(38):35088-96
- Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, Gage FH, Glass CK. "A Nurr1/CoREST Pathway in Microglia and Astrocytes Protects Dopaminergic Neurons from Inflammation Induced Death". (2009). *Cell* 137: 47-59.
- Salazar M, Rojo AI, Velasco D, de Sagarra RM, Cuadrado A. "Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response

- by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2". (2006). *J Biol Chem*; 281(21):14841-51.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, *et al*, (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez C, Pérez M, Avila J. "GSK3beta-mediated phosphorylation of the microtubule-associated protein 2C (MAP2C) prevents microtubule bundling". (2000). *Eur J Cell Biol.*; 79(4):252-60.
- Sasaki K, Suzuki A, Kagatsume S, Ono M, Matsuzawa K, Taguchi Y, Kurihara Y. "Acetylation of Prnp K150 regulates the subcellular localization". *Y. (2012). Gene.*; 491(1):13-9.
- Saucedo-Cardenas O., Kardon R., Ediger T.R., Lydon J.P., Conneely O.M. (1997) "Cloning and structural organization of the gene encoding the murine nuclear receptor transcription factor, NURR1". *Gene* 187(1); 135-9.
- Sidell KR, Amamath V, Montine TJ. "Dopamine thioethers in neurodegeneration". (2001). *Curr Top Med Chem.* ;1(6):519-27. Review.
- Smith E, Frenkel B. "Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3beta-dependent and -independent manner". (2005). *J Biol Chem* 280: 2388–2394.
- Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. "Nucleocytoplasmic transport of proteins". (2007). *Biochemistry (Mosc).* ;72(13):1439-57.
- Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE. "Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine". (1999). *J Neurosci Res.*;55(6):659-65. Review.
- Takeda A, Mallory M, Sundsmo M, Honer W, Hansen L, Masliah E., "Abnormal accumulation of NACP/alpha-synuclein in neurodegenerative disorders". (1998). *J. Pathol.* 152: 367–372.
- Theodore M, Kawai Y, Yang J, Kleshchenko Y, Reddy SP, Villalta F, Arinze IJ. "Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2". (2008). *J Biol Chem.*;283(14):8984-94
- Wakabayashi K, Engelender S, Yoshimoto M, Tsuji S, Ross CA, Takahashi H. "Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease". (2000). *Ann Neurol.*; 47(4):521-3.
- Wang W, Yang Y, Ying C, Li W, Ruan H, Zhu X, You Y, Han Y, Chen R, Wang Y, Li M. "Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta protects dopaminergic neurons from MPTP toxicity". (2007). *Neuropharmacology.*; 52(8):1678-84.
- Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, Xu H, Walker NP, Perlmann T., "Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand independent nuclear receptor". (2003) *Nature* 423; 555-560.
- Wingate AD, Campbell DG, Pegg M, Arthur JS. "Nur77 is phosphorylated in cells by RSK in response to mitogenic stimulation". (2006). *Biochem J.*; 393(Pt 3):715-24.
- Wu Y, Ghosh S, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Hu Y. "The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFI-B modulate aromatase gene expression in ovarian granulosa cells: a possible mechanism for repression of aromatase expression upon luteinizing hormone surge". (2005). *Endocrinology.* ; 146(1):237-46. Epub 2004 Oct 14.
- Xu, P.Y., Liang, R., Jankovic, Hunter, C., Zeng, Y.X., Ashizawa, T., Lai, D., Le, W.D., "Association of homozygous 7048G7049 variant in intron six of Nurr1 gene with Parkinson disease". (2002). *Neurology* 58, 881–884.

- Xu, P.Y., Liang, R., Jankovic, Hunter, C., Zeng, Y.X., Ashizawa, T., Lai, D., Le, W.D., (2002). "Association of homozygous 7048G7049 variant in intron six of Nurr1 gene with Parkinson disease". *Neurology* 58, 881–884.
- Yang FM, Lin YC, Hu MC. "Identification of two functional nuclear localization signals mediating nuclear import of liver receptor homologue-1". (2011). *Cell Mol Life Sci.*; 68(7):1241-53
- Yeste M, Alvira D, Verdaguer E, Tajés M, Folch J, Rimbau V, Pallàs M, Camins A. "Evaluation of acute antiapoptotic effects of Li⁺ in neuronal cell cultures". (2007). *J Neural Transm.*; 114(4):405-16
- Yong Y, Ding H, Fan Z, Luo J, Ke ZJ. "Lithium fails to protect dopaminergic neurons in the 6-OHDA model of Parkinson's disease". (2011). *Neurochem Res.*; 36(3):367-74.
- Zetterström RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T. "Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice". (1997). *Science.*; 276(5310):248-50.
- Zhang T, Jia N, Fei E, Wang P, Liao Z, Ding L, Yan M, Nukina N, Zhou J, Wang G., "Nurr1 is phosphorylated by ERK2 in vitro and its phosphorylation upregulates tyrosine hydroxylase expression in SH-SY5Y cells". *Neuroscience Letters* 423 (2007) 118-122.
- Zhang T, Wang P, Ren H, Fan J, Wang G. "NGFI-B nuclear orphan receptor Nurr1 interacts with p53 and suppresses its transcriptional activity". (2009). *Mol Cancer Res.*; 7(8):1408-15.
- Zhao Y, Bruemmer D. "NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology". (2010). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* ;30(8):1535-41. Review.
- Zheng, K., Heydari, B., Simon, D.K., "A common NURR1 polymorphism associated with Parkinson disease and diffuse Lewy body disease" . (2003). *Arch.Neurol.* 60, 722–725.
- Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC. "Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition". (2004). *Nat Cell Biol.*; 6(10):931-40.

ANEXOS

Parte del trabajo presentado en esta memoria de Tesis Doctoral se encuentra recogido en el artículo **“Nuclear import and export signals control the subcellular localization of Nurr1 in response to oxidative stress”** Ángel Juan García-Yagüe, Ana I. Rojo, Isabel Lastres-Becker and Antonio Cuadrado. J. Biol. Chem. (2012) Enviado a publicar.

Sin estar relacionado con el trabajo presentado en esta memoria, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral ha tenido lugar la publicación del artículo **“The Transcription Factor Nrf2 Is a Therapeutic Target against Brain Inflammation”** Nadia G. Innamorato, Ana I. Rojo, Ángel J. García-Yagüe, Masayuki Yamamoto, María L. de Ceballos and Antonio Cuadrado. J. Immunol. (2008) 181(1):680-9.

Nuclear import and export signals control the subcellular localization of Nurr1 in response to oxidative stress

Ángel Juan García-Yagüe^{1,2}, Ana I. Rojo^{1,3}, Isabel Lastres-Becker^{1,2} and Antonio Cuadrado^{1,2*}

¹Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain.

²Departamento de Bioquímica e Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain.

³ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Running title: Nuclear import and export of Nurr1

* To whom correspondence should be addressed: Prof. Antonio Cuadrado, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" UAM-CSIC, c/ Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain, Tel: +34 915854383, Fax: +34 915854401. E-mail: antonio.cuadrado@uam.es

Keywords: Nurr1, oxidative stress, Parkinson's disease, sodium arsenite, subcellular localization.

Background: Nurr1 is regulated by phosphorylation, sumoylation or by dimerization with glucocorticoid or retinoid receptors.

Results: Nurr1 possesses two NLS and two NES signals implicated in its subcellular trafficking. Nurr1 can be regulated by changes in its subcellular localization.

Conclusion: Oxidative stress can unbalance the subcellular distribution of Nurr1 to the cytoplasm.

Significance: Understanding how Nurr1 can be at different subcellular compartments depending on the redox status of the cell is critical for understanding its physiological function of this transcription factor.

SUMMARY

Transcription factor Nurr1/NR4A2 participates in development and maintenance of dopaminergic phenotype in

nigrostriatal neurons. Alterations of this gene have been correlated with Parkinson's disease. However, it is not known how oxidative stress, a major culprit of dopaminergic neurodegeneration, affects Nurr1. In this study, we have identified nuclear import and export signals of Nurr1. We demonstrate that Nurr1 contains a bipartite nuclear localization signal (NLS) within its DNA-binding domain and a leucine-rich nuclear export signal in its ligand binding domain. Together these signals regulate Nurr1 shuttling in and out of the nucleus. Immunofluorescence and immunoblot analysis revealed that Nurr1 is mostly nuclear under resting conditions. However, it accumulates in the cytosol within 30 min of treatment with sodium arsenite, an agent that induces oxidative and mitochondrial stress. A Nurr1 mutant lacking the NLS failed to enter the nucleus. The Nurr1 NLS sequence, when fused to

green fluorescence protein, resulted in the nuclear accumulation of green fluorescence protein, indicating that this sequence was sufficient to direct nuclear localization of Nurr1. A nuclear export signal (NES) was characterized in the ligand binding domain, the deletion of which caused Nurr1 to accumulate predominantly in the nucleus. The Nurr1 NES was sensitive to CRM1 and could function as an independent export signal when fused to GFP. These results led to the conclusion that Nurr1 localization between cytosol and nucleus is controlled by both nuclear import and export, and that oxidative stress can unbalance the distribution of Nurr1 in favor of cytosolic accumulation of Nurr1.

INTRODUCTION

Transcription factor Nurr1 (NOT/NR4A2) together with Nurr77, (NGIF-B/NR4A1) and Nor-1 (MINOR/NR4A3) constitute the orphan receptor group of the steroid nuclear hormone receptor superfamily (1). Unlike most other nuclear receptors, crystal structure and NMR data indicate that orphan receptors can function as ligand-independent transcription factors because the putative ligand binding domain is occupied by several bulky hydrophobic side chains (2,3). All three receptors trans-activate target genes through monomer binding to a consensus NBRE (Nerve Growth Factor Responsive Element) sequence (AAAGGTCA) or homodimer binding to the palindromic NurRE sequence (AAAT(G/A)(C/T)CA) (4,5). Nurr1 can also heterodimerize with 9-cis-retinoic acid receptor (RXR) to mediate retinoid signaling (6,7).

The three orphan receptors are involved in a wide variety of biological processes such as development and survival of dopaminergic neurons (8), regulation of macrophage inflammatory genes (9), proliferation of vascular smooth muscle cells (10), and progression of cancer cells by suppressing apoptosis (11-13). Regarding Nurr1, it is expressed predominantly in the CNS in midbrain (*Substantia nigra* and ventral tegmental area) and limbic areas and is responsible for acquisition and maintenance of neuronal dopaminergic phenotype. It controls

dopamine metabolism by inducing expression of tyrosine hydroxylase (TH), dopamine transporter (DAT), monoamine vesicular transporter 2 (VMAT2), L-aromatic amino acid descarboxylase (AADC), etc (14,15). In humans, mutations in Nurr1 gene have been associated with neurologic diseases including Parkinson disease, schizophrenia, and manic depression (9-11). In animal models, homozygous Nurr1-knockout mice are lethal due to lack mesencephalic dopaminergic neurons, which are known to degenerate in Parkinson's disease (8,15,16) while heterozygous mice exhibit high vulnerability to the parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Nurr1 modulates the inflammatory response in midbrain astrocytes and microglia, suggesting a role in protection against these processes that are intimately ligated to neurodegeneration. Other functions associated with Nurr1 include regulation of osteocalcin in osteoblasts (17,18), aldosterone synthase in adrenal cortex (19), and aromatase in ovarian granulosa cells (20). Moreover, Nurr1 participates in development of some colorectal, bladder and lung cancers. Therefore, a characterization of physiological and pathological mechanism that regulate Nurr1 transcriptional activity may provide better evidence on the relevance of Nurr1 as a new therapeutic target for these diseases

Nurr1 is regulated primarily by phosphorylation by ERK or Akt, sumoylation by PIAS γ or by dimerization with glucocorticoid or retinoid receptors. However, little is known on the mechanism involved in regulation of its subcellular localization under both basal and stimulus-induced conditions. Cytoplasm-nucleus and nucleus-cytoplasm trafficking through nuclear pores is mediated by a variety of nuclear importin and exportin proteins (21) which recognize the nuclear location signals (NLSs) (22) or nuclear export signals (NESs) (23) on cargo proteins and facilitate their transport in a Ran GTPase-dependent manner. In the case of nuclear export, CRM1 (chromosome region maintenance-1) has been characterized as a nuclear exportin (24). Many posttranslational modifications such as

phosphorylation, acetylation, and oxidation, can alter the cytoplasmic to nuclear ratios of proteins (3, 19-24). Among these modifications oxidative stress has been associated with significant alterations in nuclear transport (25) and may be of great relevance in neurodegenerative diseases and other pathologies.

There is indeed some evidence that a related member of the orphan receptor family, Nur77, is regulated by oxidative stress and this may contribute to neuronal death. Nur77 is up-regulated, phosphorylated, and translocated from the nucleus into the cytosol and mitochondria by H₂O₂ treatment in HEK293 cells, as well as by 6-hydroxydopamine in dopaminergic SH-SY5Y cells. Those results further demonstrated that nuclear export of Nur77 sensitized cells to oxidative stress-induced cell death (26).

In this study we have characterized two nuclear import signals (NLS) and two nuclear export signals (NES) which are responsive to exportin-1 (CRM1) in Nurr1. We also provide evidence that oxidative stress provokes nuclear export of Nurr1. These results uncover a new mechanism of regulation of nuclear/cytoplasm shuttling of Nurr1 that explain how oxidative stress participates in loss of Nurr1 transcriptional.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture and reagents. Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 80 µg/ml gentamycin. MN9D is an immortalized dopamine-containing neuronal cell line derived from mouse mesencephalon (Choi et al. 1992). MN9D cells were cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 80 mg/ml gentamycin. Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium containing 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 10% fetal bovine serum.

Plasmids. Vector pCI-HA-CRM1 was provided by Dr. Diehl (*Leonard and Madlyn Abramson Family Cancer Research Institute and Cancer Center, Department of*

Cancer Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia). Vectors pGL3-NBRE3xLuc and pGL3-TkLuc was provided by Dr. Philippe Lefebvre (*INSERM U545, Lille; Institut Pasteur de Lille, De'partement d'Athe'roscle'rose, 59019 Lille, France*). pcDNA3.1Nurr1-V5His was generated using Nurr1 wild-type fragment from to vector pCMX-Nurr1 provided by Dr. Kazuhiko Umesono (*Dept. Molecular Biology and Genetic, Institute for Virus Research, Kyoto University*). pCMX-Nurr1 was used as a template to generate Nurr1 PCR insert with the following oligonucleotides introducing the restriction site inserted at both ends EcoRV (*Forward: 5'-TGCAGATATCATGCCTTGTGTTTCAGGCGCA-3'*) and NotI (*Reverse: 5'-TCGAGCGGCCGCAAGGT AAGGTGTCCAGGAAA-3'*). The insert comes into frame obtained with the vector to be added to the tag protein expressed V5 and 6xHis tail that provides the plasmids. Nurr1 NES and NLS mutants were generated with the commercial kit *Gene Tailor Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen) using as template pcDNA3.1Nurr1-V5His. Oligonucleotides to generate Nurr1 NES1 mutant were (*Forward: 5'-TTGAATCAGCTTTCTTAG AAGCATTTGCTCTGCGCGCAGCATACAGGT-3'* and *Reverse: 5'-TTCTAAGAAA GCTGATTCAAAAAGCAGGTC-3'*), Nurr1 NES2 mutant were (*Forward: 5'-GCACCCCTTTGCACACAGGGCGCCCA GCGCGCTTTCTACGCGAAAGCGGAA GACTTGG-3'* and *Reverse: GCCCTGTGT GCAAAGGGTGCGGAGTTCTGG-3'*) and Nurr1 NES1/2 mutant was generated with oligonucleotides of Nurr1 NES2 mutant using as template Nurr1 NES1 mutant. Oligonucleotides to generate Nurr1 NLS1 mutant were (*Forward: 5'-ATAAAACTGCCAGTGGACGCGGC CGCCGCAAATGCTTGTCTAGTACT-3'*, *Reverse: 5'-GTCCACTGGGCGAGTTTTTA TTTGCTAAACA-3'*), Nurr1 NLS2 mutant were (*Forward: 5-TGGTTCGCACGGAC AGTTTAGCAGGCGCGGCAGGTGCTT TACCCTCGGCGCCGCGAGCCCACA GG-3'*, *Reverse: 5'-TAAACTGTCCGTGC GAACCACTTCTTTAAC-3'*) and Nurr1 NLS1/2 mutant was generated with oligonucleotides of Nurr1 NLS2 mutant using as template Nurr1 NLS1 mutant. pCI-

EGFP-NES1, pCI-EGFP-NES2, pEGFP-NLS1 and pCI-EGFP-NLS2 were generated introducing sequences of NES1 (*Forward*: 5'- GATCAGCTTTCTTAGAATTATTTG TTCTGCGCTTAGCATACAGGTCCAAC G-3' and *Reverse*: 5'-TCCGTTGGACCTG TATGCTAAGCGCAGAACAAATAATT CTAAGAAAGCT-3'), NES2 (*Forward*: 5'-GATCAACACAGGGCCTCCAGCGC ATTTTCTACCTGAAATTGGAAGACTT GG-3' and *Reverse*: GATC CCAAGTCTT CCAATTTTCAGGTAGAAAATGCGCTG GAGGCCCTGTGTT-3'), NLS1 (*Forward*: 5'-AATTTAGTGGACAAGCGCCCCGA AATCGTTGTCAGG-3' and *Reverse*: 5'- GATCCCTGACAACGATTTTCGGCGGC GCTTGTCCACTA-3') and NLS2 (*Forward*: 5'-GATCATTAAGGCCGG AGAGGTCGTTTACCCTCGAAGCCGA AGAGCG-3' and *Reverse*: 5'-GATCCGC TCTTCGGCTTCGAGGGTAAACGACCT CTCCGGCCTTTT) on pCI-EGFP 3'-end. Forward and complementary oligonucleotides were annealed at final oligonucleotide concentration of 100 pM at 80 °C for 2 min. The mixture was then slowly cooled to 4 °C with a thermal profile of 1 °C/min. 50 pM of double-stranded oligonucleotide was 5'-end-phosphorylated using T4 polynucleotide kinase (Promega) with 1mM ATP. Cloning was performed using restriction enzymes BglII 5'-end and BamHI 3'-end.

Luciferase Assays. HEK293T cells were seeded in 24-well plates (75,000 cells per well), cultured for 16h and transfected with luciferase reporter plasmid pGL3-NBRE3xLuc and pGL3-TkLuc using calcium phosphate. After 24 h from transfection, cells were lysed and assayed for luciferase activity with the luciferase assay system (Promega), according to the manufacturer's instructions. Relative light units were measured in GLOMAX 96 microplates luminometer (Promega).

Preparation of Nuclear and Cytosolic Extracts. MN9D cells, SH-SY5Y cells and HEK293T cells were seeded in p60 plates (7×10^5 cells per plate). HEK293T cells cultures for 16h were transfected with calcium phosphate, and after 24 h from transfection, cells were, in some cases, treated with Sodium Arsenite solution (Sigma-Aldrich) 100µM for 30min and 60 min. Cytosolic and nuclear fractions were

prepared as previously described (27). Briefly, cells were washed with cold PBS and harvested by centrifugation at 1100 rpm for 10 min. The cell pellet was resuspended carefully in three pellet volumes of cold buffer A (20 mM HEPES, pH 7.0, 0.15 mM EDTA, 0.015 mM EGTA, 10 mM KCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 20 mM NaF, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1% Nonidet P-40, 1 µg/ml leupeptin). Then, the homogenate was centrifuged at $500 \times g$ for 5 min. The supernatant corresponding to the cytosolic fraction was resolved in SDS-PAGE and immunoblotted with anti-V5 or anti-HA antibodies. The nuclear pellet was resuspended in five pellet volumes of cold buffer B (10 mM HEPES, pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM PSMF, 20 mM NaF, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 25% glycerol, 0.1 mM NaCl, 1 µg/ml leupeptin). After centrifugation in the same conditions indicated above, the nuclei were resuspended in two pellet volumes of hypertonic cold buffer C (10 mM HEPES, pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 20 mM NaF, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 25% glycerol, 0.4 mM NaCl, 1 µg/ml leupeptin) and were incubated for 30 min at 4 °C in a rotating wheel. Nuclear debris was removed by centrifugation at $900 \times g$ for 20 min at 4 °C. The supernatant was resolved in SDS-PAGE and immunoblotted with anti-V5 and anti-HA antibodies.

Immunocytochemistry. HEK293T cells were seeded in 24-well plates (75,000 cells per well), on poly-D-Lys covered slides, cultured for 16 h and transfected with calcium phosphate. After 24 h from transfection, cells were, in some cases, treated with Sodium Arsenite solution (Sigma-Aldrich) 100µM for 30min and 60 min. Then, cells were washed with cold PBS and fixed by incubation for 15 min at room temperature with 4% paraformaldehyde. After three 5-min washes with PBS, cells were permeabilized with 0.25% Nonidet P-40 for 10 min. The slides were incubated with primary antibodies for 1 h and 30 min at 37 °C in a humidified chamber. Then, cells were washed three times with PBS and incubated

with secondary antibodies for 45 min under the same conditions. To visualize the nuclei, cells were stained with DAPI. The fluorescence images were captured using appropriate filters in a Leica DMIRE2TCS SP2 confocal microscope (Nussloch, Germany). The lasers used were Ar 488 nm for green fluorescence, Ar/HeNe 543 nm for red fluorescence and finally ArUV 351 nm 364 nm for UV fluorescence. Primary antibodies used in immunocytochemistry were mouse anti-V5 (Invitrogen) and rabbit anti-HA (Abcam). Secondary antibodies were Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor 546-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes).

Immunoblotting. The primary antibodies used were anti-V5 (Invitrogen, Carlsbad, CA); anti-HA (Abcam), anti-Nurr1 (Chemicon), anti-actin and anti-lamin B (Santa Cruz biotechnology, INC). Cells were washed once with cold PBS and lysed on ice with lysis buffer RIPA (150 mM NaCl, 25 mM Tris HCl, pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1% Nonidet P-40, 1 µg/ml leupeptin, 1mM EGTA, 1% Sodium deoxycholate, 0,1% sodium dodecyl sulfate. Precleared cell lysates were resolved in SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Billerica, MA). These membranes were analyzed using the primary antibodies indicated above and appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies. Proteins were detected by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).

RESULTS

In preliminary experiments, we analyzed the subcellular distribution of Nurr1 in two dopaminergic cells lines, SH-SY5Y and MN9D, of human and murine origin respectively. As shown in Fig. 1A, subcellular fractionation assays demonstrated that a majority of Nurr1 is located in the nucleus and a minor fraction is present in the cytosol in both cell types. We generated a V5-tagged version of mouse Nurr1 to identify and characterize import and export signals. Subcellular fractionation assays (Fig. 1C) and immunofluorescence staining (Fig. 1D) indicated that V5-Nurr1 exhibits a similar

distribution as endogenous protein in dopaminergic cells, with a mayor tendency to be located at the nucleus.

Analysis of the Nurr1 sequence tentatively suggested one bipartite nuclear localization signal at positions 287 to 314, located within the DBD (Fig. 2A and 2D). This putative NLS (termed here NLS1) conforms the consensus structure of typical NLS (ZZX₍₁₀₋₂₀₎ZZZ where Z is Lys or Arg and X is any amino acid) as those found in other nuclear proteins such as nucleoplasmin, p73, p53 and Nrf2 (Fig. 2B) and also in other members orphan receptors (Fig. 2C). In addition, we found a second putative atypical NLS (termed here NLS2) consisting of scattered Arg and Lys residues in a small stretch of 12 amino acids at positions 338 to 350, also in the DBD (Fig. 2A and 2D). This sequence was also conserved in other orphan receptors (Fig. 2C). To determine if these NLSs are functional, we made V5-tagged point mutants of Nurr1, where some Lys or Arg residues had been muted to Ala to generate Nurr1-NLS1*, Nurr1-NLS2* and Nurr1-NLS1/2* carrying mutations in the putative NLS1, NLS2 or both respectively (Fig. 3A). HEK293T cells were transfected with these constructs and analysed by immunofluorescence (Fig. 3B) and cell fractionation (Fig. 3C). Both approaches indicated that wild type Nurr1 was mostly nuclear while all NLS mutants were mostly cytosolic. In additional experiments, HEK293T cells were co-transfected with expression vectors for Nurr1 and Nurr1-NLS mutants and a luciferase reporter construct carrying three tandem sequences of the Nurr1 responsive element (NBRE-Luc3x). As shown in Fig. 3D, wild type Nurr1 activated this reporter in a dose-dependent manner. By contrast, the Nurr1-NLS2 mutant did not activate this reporter despite it was expressed to a similar level as wild type Nurr1. These results indicate that both regions NLS1 and NLS2 are part of a bipartite NLS and that both sequences are required for nuclear localization of Nurr1.

We made chimeric proteins with enhanced green fluorescence protein fused at its carboxyl terminal end with either NLS1 or NLS2 to generate EGFP-NLS1 and EGFP-NLS2 (Fig. 4A). In HEK293T-transfected cells, EGFP was localized at

both nucleus and cytoplasm with higher levels in the nucleus. EGFP-NLS1 exhibited a similar distribution as EGFP alone. However, EGFP-NLS2 was strictly nuclear, and accumulated in nuclear bodies. These results indicate that although both NLS1 and NLS2 are required to drive Nurr1 to the nucleus (Fig. 3) the NLS2 sequence is strong enough to translocate at least EGFP.

An *in silico* search for nuclear export signals with the NetNes program (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark) suggested two putative NES in Nurr1 at positions 443-445 (NES1) and 568-577 (NES2) (Fig. 5A). Both sequences conform the consensus motif $LX_{(1-3)}LX_{(2-3)}LXL$ where L is Leu and X is any amino acid. These sequences are similar to functional NESs found in other proteins submitted to nuclear/cytoplasm shuttling such as I κ B- α , TFIIIA, hDM2, p53, p73, PKI- α , and Nrf2 (Fig. 5B). Moreover, both putative NES are conserved in orphan receptors Nurr77 and Nor-1 (Fig. 5C), and in Nurr1 from several vertebrates including mouse, human, rat, Xenopus and fish (Fig. 5D).

Nuclear export of proteins depends in most cases of exportin-1 (CRM1). Therefore, to determine if the two putative NES sequences are functional, we generated V5-tagged point mutants of Nurr1, where critical Leu and Ile residues had been changed to Ala, to generate Nurr1-NES1*, Nurr1-NES2* and Nurr1-NES1/2* (Fig. 6A). HEK293T cells were co-transfected with expression vectors for these proteins and for HA-tagged CRM1. Immunofluorescence (Fig. 6F) and cell fractionation (Fig. 6B, 6C, 6D and 6E) assays indicated that wild type and point mutants were mostly nuclear. However, in the presence of CRM1, wild type Nurr1 was redistributed back to cytosol while mutants in NES1, NES2 or both remained mostly nuclear. These results indicate that both NES sequences participate in nuclear export of Nurr1.

To further determine the relevance of each NES, we made chimeras of EGFP fused at the carboxyl terminus with either NES1 (EGFP-NES1) or NES2 (EGFP-NES2) (Fig. 7A). HEK293T cells were co-transfected with expression vectors for

these proteins and analysed by immunofluorescence (Fig. 7B). EGFP was mostly nuclear as expected and insensitive to CRM1-mediated export. By contrast, EGFP-NES1 was already cytoplasmic even in the absence of ectopically expressed HA-CRM1, suggesting that this NES1 is so strong that can be exported with endogenous exportins. EGFP-NES2 yielded a mixed cytoplasmic and nuclear pattern and required overexpression of HA-CRM1 to be exported efficiently to the cytoplasm. These results indicate that both NESs are functional but that NES1 is stronger.

Oxidative stress affects the subcellular localization of various proteins. Therefore, we decided to determine if the location of Nurr1 is susceptible to regulation by sodium arsenite. HEK293T cells were transfected with V5-tagged wild type Nurr1. After transfections cells were maintained in serum free medium for 16 h and then treated with sodium sodium arsenite (100 μ M) for 30 min and 60 min (Fig. 8A). Immunofluorescence analysis of the subcellular distribution of wild type V5-Nurr1 indicated that it was redistributed to the cytoplasm within 30 min and 60 min of sodium arsenite treatment (Fig. 8B). Similarly, Nurr1-NES1*, harbouring NES2 but not NES1, also responded to sodium arsenite, yielding Nurr1 cytosolic within this time frame. By contrast, Nurr1-NES2* and NES1/2*, both lacking the NES2, were resistant to sodium arsenite-induced translocation. Hence, these results indicate that NES2 but not NES1 is sensitive to redox regulation for the nuclear localization of Nurr1. To further quantify the effect of sodium arsenite on Nurr1 subcellular localization we performed cell fractionation assays. As shown in Fig. 8B, in response to sodium arsenite, wild type V5-Nurr1 translocated to the cytosol at 30 min and 60 min, confirming our immunofluorescence data (Fig. 8A), but unexpectedly, a significant drop in total Nurr1 protein levels was also observed suggesting that oxidative stress promotes both nuclear export and a decrease in Nurr1 protein levels. As shown in Fig. 8B pre-treatment of cells with the proteasome inhibitor MG132 prevented Nurr1 degradation and facilitated analysis of Nurr1 subcellular localization. Mutant Nurr1-NES1* responded to sodium arsenite

similarly to wild type V5-Nurr1, i.e. translocating to the cytosol at 30 and 60 min and this effect was more clearly observed in the presence of the proteasome inhibitor (Fig. 8C). By contrast, Nurr1-NES2* and Nurr1-NES1/2* were unresponsive to sodium arsenite (Fig. 8D and 8E). These results indicate that oxidative stress favours export of Nurr1 through the use of the NES2 sequence.

DISCUSSION

In this study we have analyzed the relevance of the transcription factor Nurr1 subcellular localization. We determine that Nurr1 has a main nuclear localization in different dopaminergic cellular models and in transient transfection in HEK293T cells, with a small proportion of cytosolic Nurr1. We report for the first time that Nurr1 has two NLS signals which are implicated in the nuclear localization and two NES signals involved in the nuclear-cytosol trafficking of the transcription factor. Furthermore, we demonstrated that oxidative stress mediated by sodium arsenite unbalance Nurr1 to a predominant cytoplasmic localization.

Nurr1 belongs to the orphan nuclear receptor family NR4A, like NGFI-B (NR4A1, Nur77 or TR3) and NOR-1, which appear to function independently of ligands. Moreover, these proteins seem to be regulated by expression, dimerization and post-translational modifications. (28,29). Recent evidences indicate that another regulatory mechanism is the change of subcellular localization. Related to Nur77, it has been observed that this nuclear steroid receptor posses two NLSs and three NES signals which are implicated in its redistribution from the nucleus to the cytoplasm, resulting altered transcriptional activity (30). We demonstrated that Nurr1 posses two NLS signals that we termed NLS1 and NLS2 which are part of a bipartite NLS and that both sequences are required for nuclear localization of Nurr1. There are many proteins with different number of NLS signals, all of them functional, although there is still unknown the reason of this number variability. It has been described that proteins with more than one NLS signal presented a signal dependency from one NLS over another

(31), which is in concordance with our results.

Furthermore, we observed that Nurr1 presented a predominant nuclear localization although there was a minor fraction in the cytosol. This lead us to discover two NES signals which respond to the exportin CRM1, termed as NES1 and NES2 which are conserve in other orphan receptors (30). A similar sequence of export has been identified in Nur77, a protein of the same family of orphan receptors. It has been reported that stimulation with NGF induces exported to the cytosol of Nur77/RXR dimer using this NES present in Nur77 (30). Moreover, oxidative stress is able to induce changes in subcellular localization of several proteins like the transcription factor Nrf2 (32). In these cases oxidative stress promote nuclear export and cytosol degradation due to the proteasome pathway. It has been described that Nurr1 is essential in the resistance to oxidative stress (33), therefore we analyzed the effect of oxidative stress on Nurr1 subcellular localization. Our results demonstrated that treatment with sodium arsenite induced nuclear export of Nurr1 to the cytosol, where this protein was degraded by the proteasome pathway. We speculated that this switch-off system could play an essential role in the pathogenesis of several neurodegenerative disorders like Parkinson's disease. It has been described that two different point mutations in Nurr1 gene (291T del and _245 T to G) are related to PD (34), and resulted in a marked decrease in Nurr1 mRNA levels, which affected the transcription of the gene encoding tyrosine hydroxylase. Taking together our results indicate that Nurr1 subcellular localization depends on the redox status of the cell and that NLS and NES signals are implicated in these process.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Subcellular distribution of Nrf2. A and B, cytosolic (C) and nuclear (N) fractions of dopaminergic cell lines SH-SY-5Y and MN9D showing subcellular localization of endogenous Nurr1. C, Cytosolic (C) and nuclear (N) fractions of HEK293T cells transfected with expression vector for V5-tagged mouse Nurr1 (pcDNA3.1-Nurr1-V5) showing subcellular

distribution of ectopically expressed Nurr1. *Upper panels*, immunoblots with anti-Nurr1 antibody; *middle panels*, immunoblots with anti- β -actin antibody as a control for cytosolic protein load; *lower panel*, anti-Lamin B as a control for nuclear protein load. D, Immunofluorescence analysis of Nurr1-V5 with anti-V5 antibody in HEK293T-transfected cells.

Figure 2. Putative bipartite NLS sequence in Nurr1. A, primary structure of mouse Nurr1 depicting amino acid sequences between residues 287-314 and 338-350 corresponding to putative bipartite sides NLS1 and NLS2, respectively. B, comparison of putative NLS1 and NLS2 sides of mouse Nurr1 with NLSs from other nuclear proteins. C, comparison of putative NLS1 and NLS2 from Nurr1 with other members of the mouse orphan receptor family. D, phylogenetic conservation of putative NLS1 and NLS2. The highlighted residues correspond to the assumed sites that conform the standard and atypical NLS sequences.

Figure 3. Both NLS1 and NLS2 sequences are required for nuclear localization of Nurr1. A, Point mutants used to characterize NLS1 and NLS2. B, analysis of subcellular localization by immunofluorescence with anti-V5 antibody in HEK293T cells transfected with expression vectors for V5-tagged wild type Nurr1 and mutants Nurr1-NLS1*, Nurr1-NLS2* and double mutant Nurr1-NLS1/2*. C, Cytosolic (C) and nuclear (N) fractions of HEK293T cells transfected under the same conditions. D, Induction of NBRE-driven luciferase expression by in HEK293T cells ectopically expressing Nurr1 and Nurr1-NLS2*. Cells were co-transfected with empty vector or expression vector for Nurr1 or Nurr1-NLS2* (0.2 and 0.4 μ g) and either pGL3-NBRE3xLuc or pGL3-TkLuc as a control. Cells were incubated for 16 h under serum-free conditions and analyzed for luciferase activity. Each point is the mean \pm SEM of n=3 samples. Asterisks denote statistically significant differences with $p < 0.05$. E, immunoblots of cells transfected as in D showing expression of V5-tagged Nurr1 and Nurr1-NLS2*.

Figure 4. NLS2 but not NLS1 is sufficient to confer NLS capacity. A, fusion

proteins used for analysis of the subcellular localization of EGFP. B, analysis of subcellular localization by direct immunofluorescence of EGFP fusion proteins in HEK293T transfected cells.

Figure 5. Putative NES1 and NES2 sequences in Nurr1. A, primary structure of mouse Nurr1 depicting amino acid sequences between residues 443-452 and 568-577 corresponding to putative NES1 and NES2, respectively. B, comparison with the NES from other nuclear proteins. C and E, comparison with other members of the orphan receptor family. D and F, comparison with Nurr1 from other vertebrates. The highlighted residues correspond to the putative sites that conform to the consensus sequence for a NES.

Figure 6. Exportin 1, CRM1 requires NES1 to export Nurr1. A, outline of the amino acid substitutions in Nurr1-NES1* and Nurr1-NES2*. B, C, D and E, HEK293T cells co-transfected with expression vectors for HA-tagged CRM1 and either V5-tagged wild type Nurr1 (B), Nurr1-NES1* (C), Nurr1-NES2* (D) and Nurr1-NES1/2* (E). Upper panel, anti-V5 antibodies; upper middle panel, anti-HA antibodies; lower middle panel, anti-lamin; lower middle panel anti- β -actin. F, Immunofluorescence staining of HEK293T cells transfected under the same conditions.

Figure 7. NES1 and NES2 are sufficient to confer export capacity to EGFP. A, fusion proteins used for analysis of the subcellular localization of EGFP. B, subcellular localization of EGFP fusion proteins in HEK293T cells co-transfected with HA-tagged CRM1 and EGFP, EGFP-NES1 and EGFP-NES2 as indicated.

Figure 8. Sodium arsenite targets NES2 for nuclear export of Nurr1. A, immunofluorescence analysis of the subcellular localization of Nurr1, Nurr1-NES1*, Nurr1-NES2* and Nurr1-NES1/2* in response to sodium arsenite. B, C, D, and E, subcellular localization of Nurr1, Nurr1-NES1*, Nurr1-NES2* and Nurr1-NES1/2* as determined by cell fractionation assays. F, G, H and I, densitometric quantification of cytosolic and nuclear levels from representative blots of A, B, C and D. Each point is the mean \pm SEM of n = 3 samples. Asterisks denote statistically

significant differences $p < 0.05$ of the nuclear protein levels of 30 min and 60 min compared with the control. The pads denote statistically significant differences $p < 0.05$ of the cytosolic protein levels of 30 min and 60 min compared with the control. HEK293T cells were transfected with V5-tagged Nurr1, Nurr1-NES1*, Nurr1-NES2* and Nurr1-NES1/2*. Then cells were left in serum-free medium for 16 h and incubated with vehicle or MG132. Finally cells were treated with 100 μ M sodium arsenite for 30 min and 60 min, as indicated.

REFERENCES

1. Zhao, Y., and Bruemmer, D. (2010) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 1535-1541
2. Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N. P., and Perlmann, T. (2003) *Nature* **423**, 555-560
3. Codina, A., Benoit, G., Gooch, J. T., Neuhaus, D., Perlmann, T., and Schwabe, J. W. (2004) *J Biol Chem* **279**, 53338-53345
4. Wilson, T. E., Fahrner, T. J., Johnston, M., and Milbrandt, J. (1991) *Science* **252**, 1296-1300
5. Giguere, V. (1999) *Endocr Rev* **20**, 689-725
6. Sacchetti, P., Dwornik, H., Formstecher, P., Rachez, C., and Lefebvre, P. (2002) *J Biol Chem* **277**, 35088-35096
7. Aarnisalo, P., Kim, C. H., Lee, J. W., and Perlmann, T. (2002) *J Biol Chem* **277**, 35118-35123
8. Zetterstrom, R. H., Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B. J., Olson, L., and Perlmann, T. (1997) *Science* **276**, 248-250
9. Hanna, R. N., Shaked, I., Hubbeling, H. G., Punt, J. A., Wu, R., Herrley, E., Zaugg, C., Pei, H., Geissmann, F., Ley, K., and Hedrick, C. C. (2012) *Circ Res* **110**, 416-427
10. Nomiyama, T., Nakamachi, T., Gizard, F., Heywood, E. B., Jones, K. L., Ohkura, N., Kawamori, R., Conneely, O. M., and Bruemmer, D. (2006) *J Biol Chem* **281**, 33467-33476
11. Holla, V. R., Wu, H., Shi, Q., Menter, D. G., and DuBois, R. N. (2011) *J Biol Chem* **286**, 30003-30009
12. Ke, N., Claassen, G., Yu, D. H., Albers, A., Fan, W., Tan, P., Grifman, M., Hu, X., Defife, K., Nguy, V., Meyhack, B., Brachat, A., Wong-Staal, F., and Li, Q. X. (2004) *Cancer Res* **64**, 8208-8212
13. Kolluri, S. K., Bruey-Sedano, N., Cao, X., Lin, B., Lin, F., Han, Y. H., Dawson, M. I., and Zhang, X. K. (2003) *Mol Cell Biol* **23**, 8651-8667
14. Arenas, E. (2005) *Ann N Y Acad Sci* **1049**, 51-66
15. Jankovic, J., Chen, S., and Le, W. D. (2005) *Prog Neurobiol* **77**, 128-138
16. Alavian, K. N., Scholz, C., and Simon, H. H. (2008) *Mov Disord* **23**, 319-328
17. Lammi, J., Rajalin, A. M., Huppunen, J., and Aarnisalo, P. (2007) *Biochem Biophys Res Commun* **359**, 391-397
18. Pirih, F. Q., Tang, A., Ozkurt, I. C., Nervina, J. M., and Tetradis, S. (2004) *J Biol Chem* **279**, 53167-53174
19. Bassett, M. H., Suzuki, T., Sasano, H., White, P. C., and Rainey, W. E. (2004) *Mol Endocrinol* **18**, 279-290
20. Wu, Y., Ghosh, S., Nishi, Y., Yanase, T., Nawata, H., and Hu, Y. (2005) *Endocrinology* **146**, 237-246
21. Gorlich, D., and Kutay, U. (1999) *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 607-660
22. Jans, D. A., and Hubner, S. (1996) *Physiol Rev* **76**, 651-685
23. Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y., and Taylor, S. S. (1995) *Cell* **82**, 463-473
24. Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., and Yanagawa, H. (2008) *Traffic* **9**, 2053-2062
25. Patel, V. P., and Chu, C. T. (2011) *Int J Clin Exp Pathol* **4**, 215-229
26. No, H., Bang, Y., Lim, J., Kim, S. S., Choi, H. S., and Choi, H. J. (2010) *Neurochem Int* **56**, 620-626

27. Rojo, A. I., Salinas, M., Martin, D., Perona, R., and Cuadrado, A. (2004) *J Neurosci* **24**, 7324-7334
28. Maxwell, M. A., and Muscat, G. E. (2006) *Nucl Recept Signal* **4**, e002
29. Wingate, A. D., and Arthur, J. S. (2006) *Biochem Soc Trans* **34**, 1107-1109
30. Katagiri, Y., Takeda, K., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Ozato, K., and Guroff, G. (2000) *Nat Cell Biol* **2**, 435-440
31. Theodore, M., Kawai, Y., Yang, J., Kleshchenko, Y., Reddy, S. P., Villalta, F., and Arinze, I. J. (2008) *J Biol Chem* **283**, 8984-8994
32. Rojo, A. I., Sagarra, M. R., and Cuadrado, A. (2008) *J Neurochem* **105**, 192-202
33. Sousa, K. M., Mira, H., Hall, A. C., Jansson-Sjostrand, L., Kusakabe, M., and Arenas, E. (2007) *Stem Cells* **25**, 511-519
34. Le, W. D., Xu, P., Jankovic, J., Jiang, H., Appel, S. H., Smith, R. G., and Vassilatis, D. K. (2003) *Nat Genet* **33**, 85-89

Figure 1

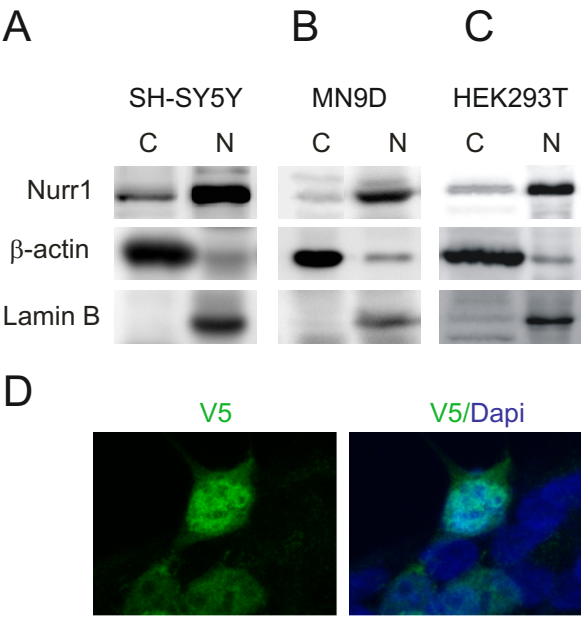
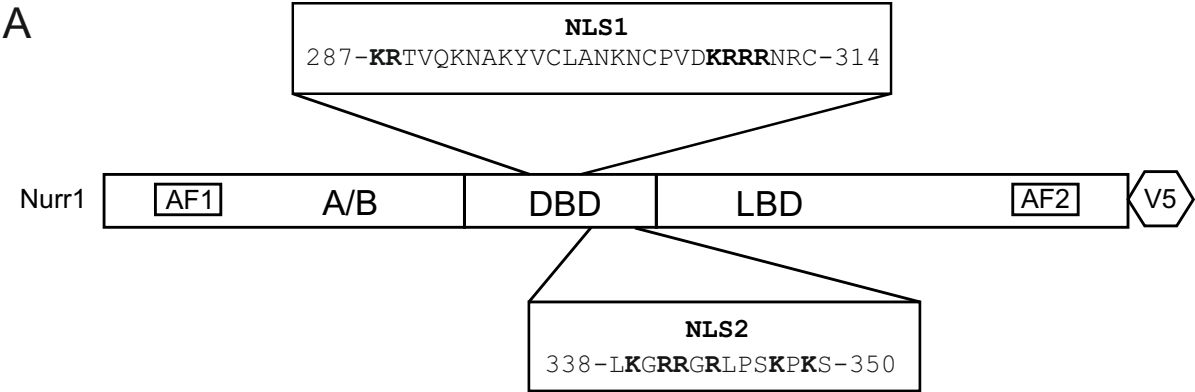


Figure 2



B

consensus NLS: ZZX₍₁₀₋₂₀₎ZZZZ
Z= K or R
X= other aminoacid

atypical NLS

Nurr1 (NLS1)	KR TVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRRNRC	Nurr1 (NLS2)	LKGRRGRLPSKPKS
Nucleoplasmin	KRPAATKKAGQAKKKLD	Nrf2 (NLS1)	RQKDYELEKQKK
p73	KRAFKQSPPAVPALGAGVKRRR	Nrf2 (NLS3)	PKSKKPD
p53	KRALPNNTSSSPQPKKKP		
Nrf2 (NLS2)	RRRGKQKVAANQCRKRK		

C

	Mouse NLS1	Mouse NLS2
NURR1	FFKR TVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRRNRCQYCRFQKCLAVGMVKEVVRTDSL	LKGRRGRLPSKPKSPQ
NUR77	FFKR TVQKSAKYICLANKDCPVDKRRRNRCQFCRFQKCLAVGMVKEVVRTDSL	LKGRRGRLPSKPKQPP
NOR-1	FFKR TVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRRNRCQYCRFQKCLSVGMVKEVVRTDSL	LKGRRGRLPSKPKSPL

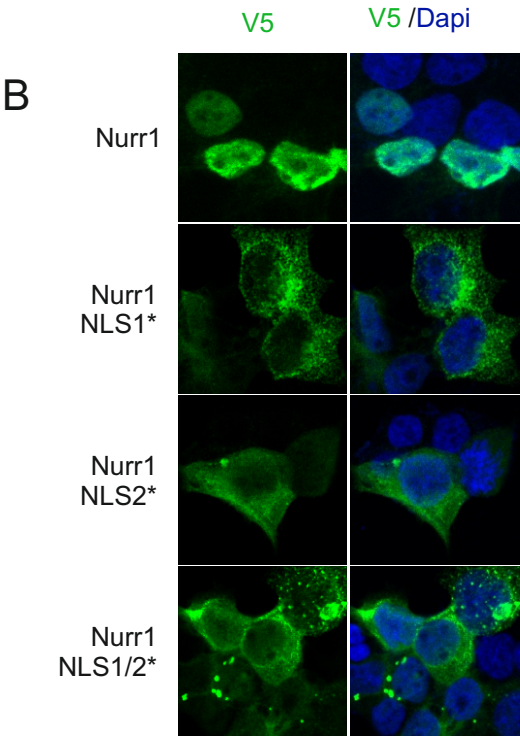
D

	NLS1	NLS2
MOUSE	FFKR TVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRRNRCQYCRFQKCLAVGMVKEVVRTDSL	LKGRRGRLPSKPKSPQ
HUMAM	FFKR TVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRRNRCQYCRFQKCLAVGMVKEVVRTDSL	LKGRRGRLPSKPKSPQ
RAT	FFKR TVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRRNRCQYCRFQKCLAVGMVKEVVRTDSL	LKGRRGRLPSKPKSPQ
XENOPUS	FFKR TVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRRNRCQYCRFQKCLAVGMVKEVVRTDSL	LKGRRGRLPSKPKSPQ
ZEBRA-FISH	FFKR TVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRRNRCQYCRFQKCLAVGMVKEVVRTDSL	LKGRRGRLPSKPKSPQ

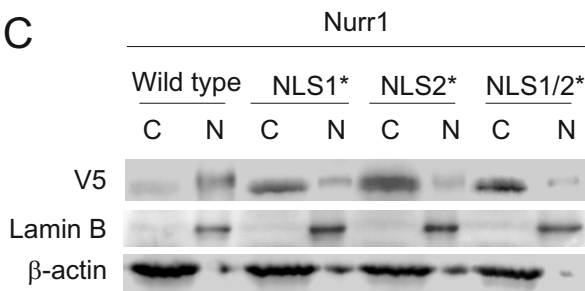
Figure 3

A

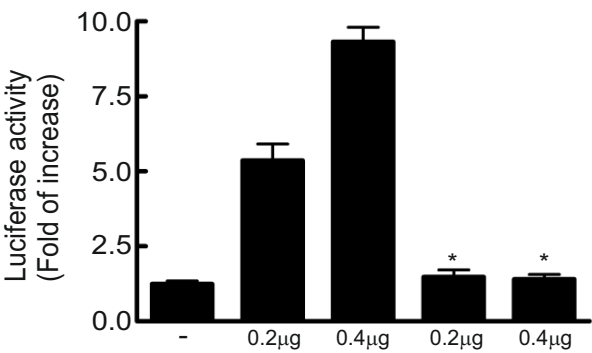
Nurr1-NLS1*:
287-**KR**TVQKNAKYVCLANKNCPVD**AAAA**NRC-314
Nurr1-NLS2*:
338-**LA****GAAG**ALPS**APAS**-350



C



D



E

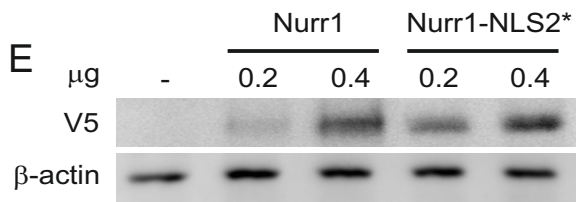


Figure 4

A

EGFP-NLS1: EGFP-DKRRRNRC

EGFP-NLS2: EGFP-LKGRRGRLPSKPKS

B

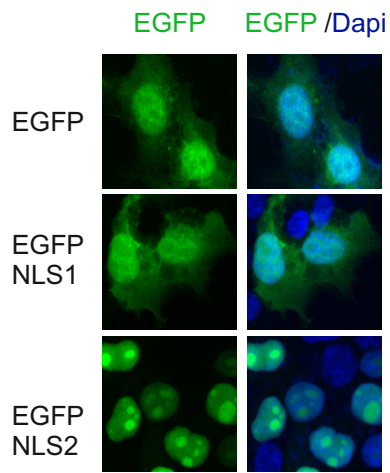


Figure 5

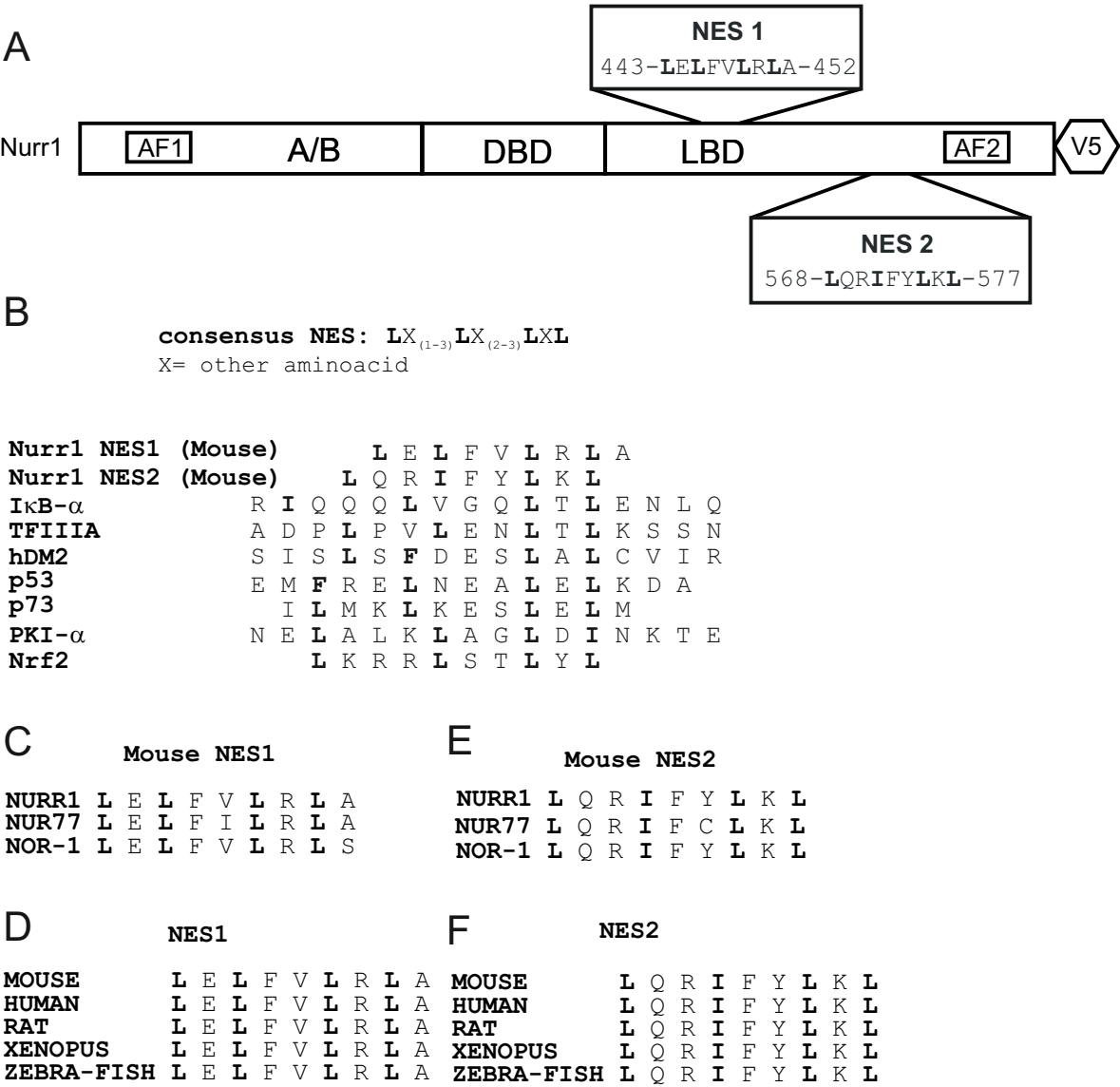


Figure 6

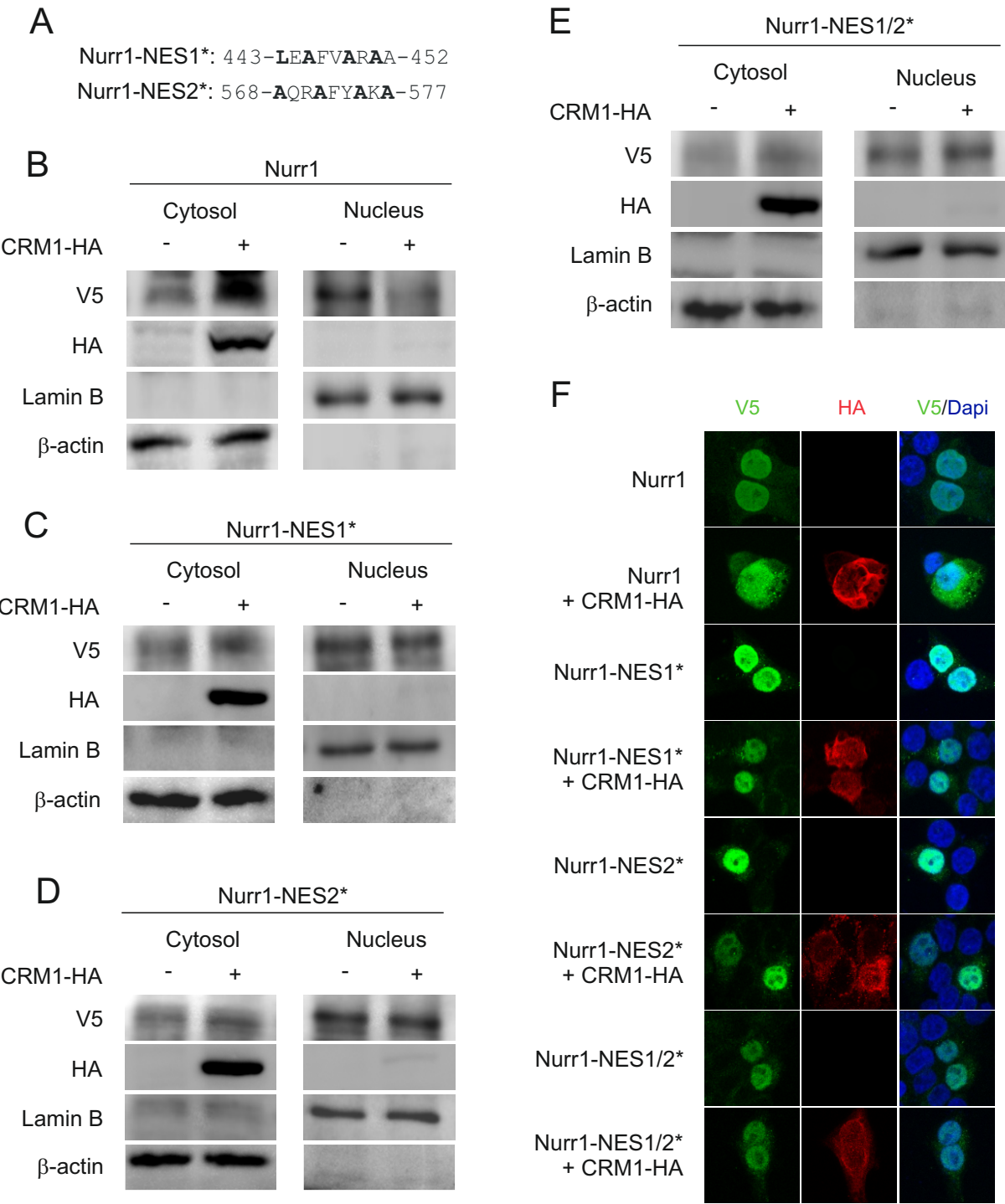


Figure 7

A

EGFP-NES1: EGFP-LELFVLRLA
EGFP-NES2: EGFP-LQRIFYLKL

B

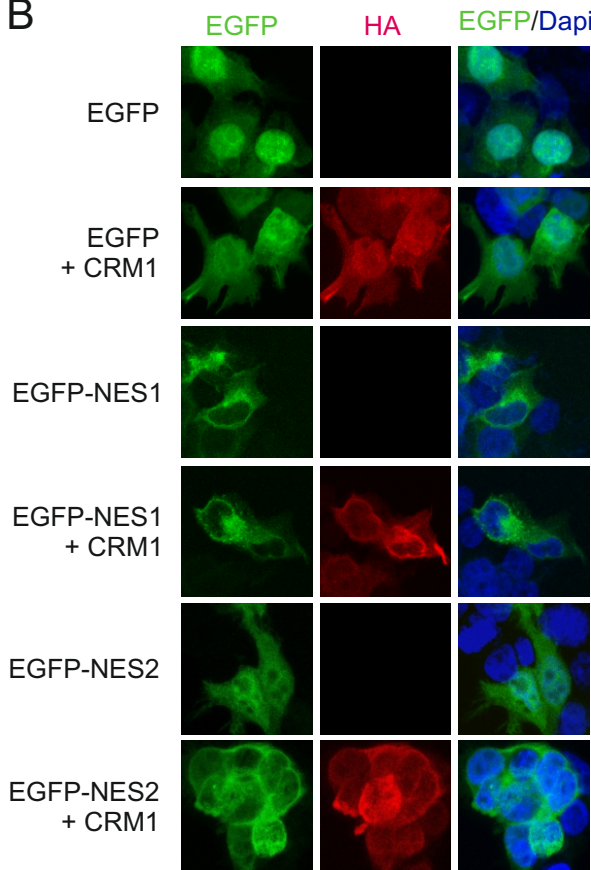
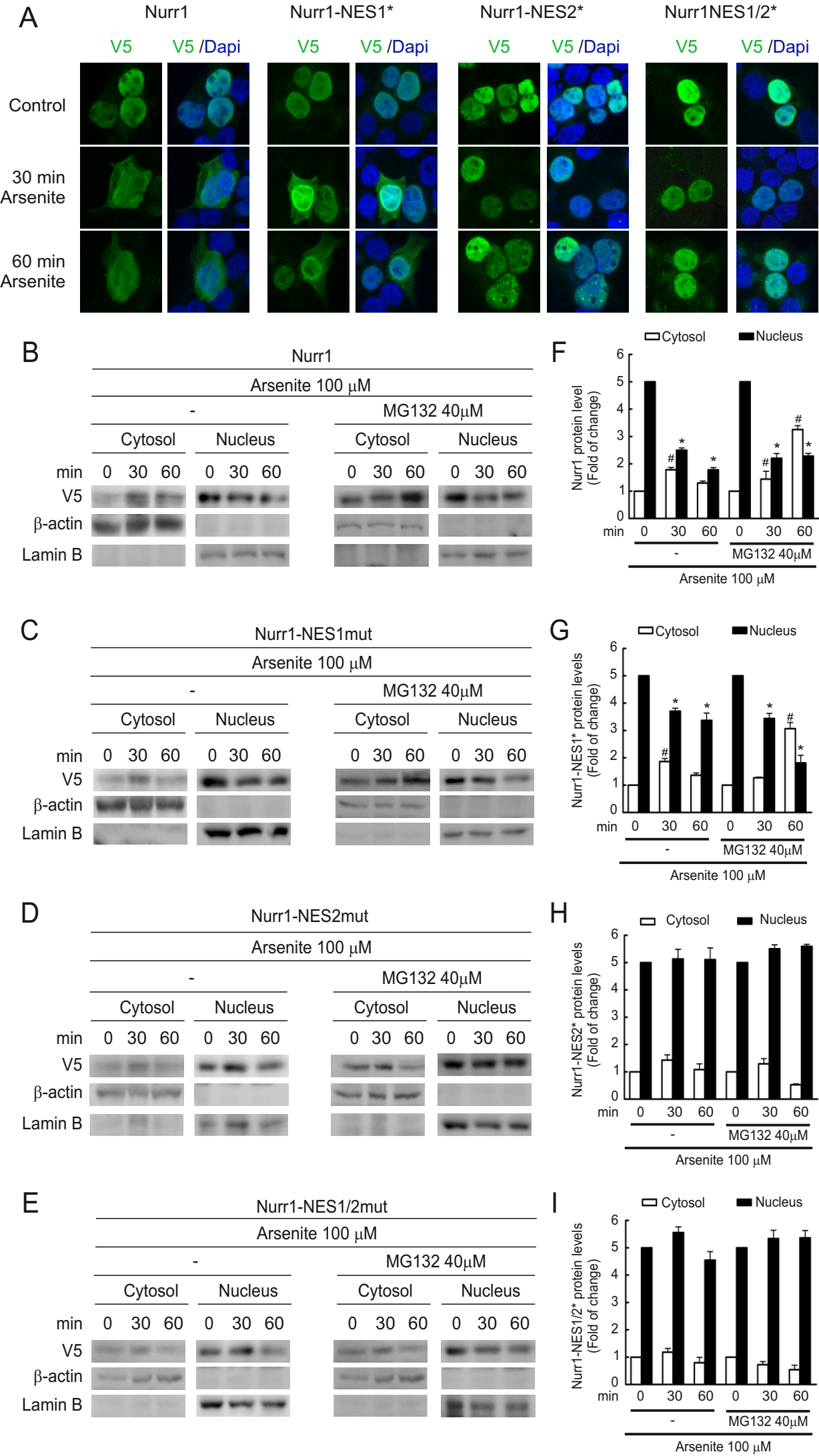


Figure 8





The Transcription Factor Nrf2 Is a Therapeutic Target against Brain Inflammation

Nadia G. Innamorato, Ana I. Rojo, Ángel J. García-Yagüe, Masayuki Yamamoto, María L. de Ceballos and Antonio Cuadrado

This information is current as of May 3, 2012

J Immunol 2008;181:680-689

References

This article **cites 36 articles**, 17 of which can be accessed free at:
<http://www.jimmunol.org/content/181/1/680.full.html#ref-list-1>

Article cited in:

<http://www.jimmunol.org/content/181/1/680.full.html#related-urls>

Subscriptions

Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at
<http://www.jimmunol.org/subscriptions>

Permissions

Submit copyright permission requests at
<http://www.aai.org/ji/copyright.html>

Email Alerts

Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at
<http://www.jimmunol.org/etoc/subscriptions.shtml/>



The Transcription Factor Nrf2 Is a Therapeutic Target against Brain Inflammation¹

Nadia G. Innamorato,^{*†} Ana I. Rojo,^{*†} Ángel J. García-Yagüe,^{*†} Masayuki Yamamoto,[‡] María L. de Ceballos,^{†§} and Antonio Cuadrado^{2*†}

Because chronic neuroinflammation is a hallmark of neurodegenerative diseases and compromises neuron viability, it is imperative to discover pharmacologic targets to modulate the activation of immune brain cells, the microglia. In this study, we identify the transcription factor Nrf2, guardian of redox homeostasis, as such target in a model of LPS-induced inflammation in mouse hippocampus. Nrf2 knockout mice were hypersensitive to the neuroinflammation induced by LPS, as determined by an increase in F4/80 mRNA and protein, indicative of an increase in microglial cells, and in the inflammation markers inducible NO synthase, IL-6, and TNF- α , compared with the hippocampi of wild-type littermates. The aliphatic isothiocyanate sulforaphane elicited an Nrf2-mediated antioxidant response in the BV2 microglial cell line, determined by flow cytometry of cells incubated with the redox sensitive probe dihydrodichlorofluorescein diacetate, and by the Nrf2-dependent induction of the phase II antioxidant enzyme heme oxygenase-1. Animals treated with sulforaphane displayed a 2–3-fold increase in heme oxygenase-1, a reduced abundance of microglial cells in the hippocampus and an attenuated production of inflammation markers (inducible NO synthase, IL-6, and TNF- α) in response to LPS. Considering that release of reactive oxygen species is a property of activated microglia, we propose a model in which late induction of Nrf2 intervenes in the down-regulation of microglia. This study opens the possibility of targeting Nrf2 in brain as a means to modulate neuroinflammation. *The Journal of Immunology*, 2008, 181: 680–689.

In response to multiple noxious stimuli, microglia enters a state of activation that is characterized by the production of chemotactic molecules, metalloproteases, and proinflammatory cytokines (1, 2). Crucial to microglial activation is the production of intracellular and extracellular reactive oxygen species (ROS),³ mainly through the activation of NADPH oxidase (3). ROS released by microglia contribute to elimination of pathogens and also act as second messengers that activate MAPKs and NF- κ B and result in further expression of proinflammatory cytokines (4). Persistent ROS and cytokine release from microglia results in peroxidation of lipids and other macromolecules and in activation of apoptotic programs, leading to neuronal death (5). Hence, if microglial activation is not properly controlled, it may lead to a vicious cycle of neuroinflam-

mation that results in neuronal damage. Magnitude and duration of the brain inflammatory response are events that should be modulated by pharmacological means if the proper molecular targets can be found.

The transcription factor Nrf2 is the guardian of redox homeostasis. Under oxidant conditions, it activates a battery of antioxidant and cytoprotective genes that share in common a *cis*-acting enhancer sequence termed antioxidant response element (ARE) that include heme oxygenase-1 (HO-1). Recently, several research groups have reported the relevance of HO-1 in immunomodulation of macrophages, an immune cell type that, like microglia, belongs to the reticuloendothelial system (6). Regarding Nrf2, several studies have demonstrated an essential role of Nrf2 as a key element in modulation of macrophage activation in lung in response to cigarette smoke extracts and to LPS (7, 8). Yet, the relevance of the Nrf2/HO-1 axis in down-regulation of brain inflammation and the design of drugs that could pass through the blood brain barrier to modulate Nrf2 activity are fundamental issues that need to be solved.

The isothiocyanate sulforaphane (SFN) is a natural product found in cruciferous vegetables (9). Although the molecular targets of this molecule are not completely characterized, the best known effect of SFN is to induce Nrf2-dependent gene expression (10). SFN has been used to down-regulate macrophage activation in *in vitro* models of inflammation (11, 12). Therefore, SFN is an excellent candidate to analyze its capacity to modulate brain inflammation in animal models.

In this study, we report that systemic administration of SFN results in Nrf2-dependent activation of antioxidant phase II enzymes such as HO-1. We show that SFN attenuates microglia-induced inflammation in hippocampus of LPS-treated mice as determined by reduced inducible NO synthase (iNOS) levels and attenuates the production of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α . Our work paves the way to assess the therapeutic role of

^{*}Departamento de Bioquímica e Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; [†]Centro de Investigación en Red en Enfermedades Neurodegenerativas, Madrid, Spain; [‡]Center for Tsukuba Advanced Alliance and Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan; and [§]Departamento de Neurobiología Celular, Molecular y del Desarrollo, Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

Received for publication January 15, 2008. Accepted for publication April 26, 2008.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Grants SAF2004-02039 and SAF2007-62646 from Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and Grant 2004 of Fundación Mutua Madrileña Automovilística.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Antonio Cuadrado, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid, Spain. E-mail address: antonio.cuadrado@uam.es

³ Abbreviations used in this paper: ROS, reactive oxygen species; ARE, antioxidant response element; H₂DCFDA, dihydrodichlorofluorescein diacetate; HO-1, heme oxygenase-1; SFN, sulforaphane.

Copyright © 2008 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/08/\$2.00

Table I. Genes, primers, and conditions for semiquantitative PCR amplification

Gene Product	Forward Primer	Reverse Primer	Fragment Size	Cycles for Linear Range ^a
Nrf2	5' TGGACGGGACTATTGAAGGCTG 3'	5' GCCGCCTTTTCAGTAGATGGAGG 3'	179	20
TNF- α	5' CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA 3'	5' TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC 3'	175	30
IL-6	5' GAGGATACCACTCCCAACAGACC 3'	5' AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA 3'	141	30
iNOS	5' CAAGAGTTTGACCAGAGGACC 3'	5' TGGAACTACTCGTACTTGGGA 3'	654	30
F4/80	5' TGCCCTTACAACATGAAGCTCCAC 3'	5' ACACCACAAGAAAGTGCAATAGGAA 3'	105	30
HO-1	5' TGCTCAACATCCAGCTCTTTGA 3'	5' GCAGAATCTGCACCTTTGTTGCT 3'	120	30
β -actin	5' TGTTTGAGACCTTCAACACC 3'	5' CGCTCATTCGCCGATAGTGAT 3'	207	21

^a Linear range was achieved with the indicated number of cycles using a 20-ng cDNA template and the thermal profile described in *Materials and Methods*.

Nrf2 activators in patients with unremitting neuroinflammation which accompanies neurodegenerative diseases.

Materials and Methods

Animals and treatments

Eight-week old male wild-type C57BL/6 mice and Nrf2-knockout littermates (13) were housed at room temperature under a 12 h light-dark cycle. Food and water was provided ad libitum. Animals were cared for according to a protocol approved by the Ethical Committee for Research of the Universidad Autónoma de Madrid following institutional, Spanish and European guidelines (Boletín Oficial del Estado (BOE) of 18 March 1988; and 86/609/EEC, 2003/65/EC European Council Directives). In preliminary experiments several SFN doses (5 to 50 mg/kg administered in one single dose or two doses per day or in daily doses for four days) were tested for brain penetration and HO-1 induction (data not shown). SFN (50 mg/kg) and LPS (1 mg/kg) were prepared in saline solution just before use. These compounds were administered by intraperitoneal injection. Once the experimental schedule was completed, animals were anesthetized with 8 mg/kg ketamine and 1.2 mg/kg xylazine and perfused.

Cell culture, plasmids, and transfections

BV2 microglial cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 80 μ g/ml gentamicin in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C with medium changed every 3–4 days. For luciferase assays, BV2 cells were plated onto 24-well plates (75,000 cells/well) and transient transfections were performed with the expression vectors pGL3basic, 3xARE-LUC, pEF- Δ Nrf2(DN) (Dr. J. Alam, Department of Molecular Genetics, Ochsner Clinic Foundation, New Orleans, LA), and pcDNA3.1/V5HisB-mNrf2 (Dr. J.D. Hayes, Biomedical Research Centre, Ninewells Hospital and Medical School, University of Dundee, Dundee, U.K.). Cells were transfected with Lipofectamine reagent (Invitrogen) and maintained for 6 h in low-serum medium. Then, cells were treated with 10 μ M SFN (LKT Laboratories). After overnight treatment, cells were analyzed for luciferase activity. Luciferase activity was assayed with the Luciferase Assay system (Promega), according to the manufacturer's instructions, and relative light units were measured in a BG1 Optocomp I, GEM Biomedical luminometer (Optocomp).

HPLC determination of SFN

Liver and hippocampus were dissected and rapidly frozen at -80°C until use. Samples were sonicated in 10 volumes (w/v) of methanol. After centrifugation, the supernatant was injected onto a C-18 column (Beckman-Coulter). The solvent system consisted of 20% acetonitrile in water with a linear change to 60% acetonitrile over 10 min, and then maintained at 100% acetonitrile for 2 min to purge the column. Column oven temperature was set at 30°C. The flow rate was 1 ml/min, and 10 μ l portions were injected into the column. SFN was detected by UV 254 nm.

Flow cytometry

A FACScan flow cytometer (BD Biosciences) was used to analyze intracellular ROS with the fluorescence probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) (Invitrogen), which passively diffuses into the cell and is cleaved and oxidized to 2',7'-dichlorofluorescein (band pass 530/25 nm). A total of 400,000 cells were seeded onto 60 mm dishes and grown for 24 h. Then, cells were treated with 10 μ M SFN for 16 h, loaded for 1 h with 10 μ M H₂DCFDA, and submitted to 1 mg/ml LPS (Sigma-Aldrich) for 2 h. Cells were detached mechanically from the plates, washed once with cold PBS, and analyzed immediately. Three independent samples of 10,000 cells were analyzed for each experimental condition.

Analysis of mRNA levels by semiquantitative RT-PCR and quantitative real-time PCR

Brains were removed and dissected, and total RNA from hippocampus was extracted using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). A total of 1 μ g of RNA from the different treatments were reverse-transcribed for 75 min at 42°C using 5 U of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega) in the presence of 20 U of RNasin (Promega). Amplification of cDNA was performed in 40 μ l of Go Taq Flexi Colorless PCR buffer (Promega) containing 0.5 U of Go Taq Flexi DNA polymerase (Promega) and 30 pmol of synthetic gene-specific primers. Primer sequences are shown in Table I. To ensure that equal amounts of cDNA were added to the PCR, the β -actin housekeeping gene was amplified. After an initial denaturation step for 4 min at 94°C, amplification of each cDNA was performed for the minimum number of cycles that allowed detection of basal mRNA levels in the linear range of each mRNA (data not shown), using a thermal profile of 1 min at 94°C (denaturation), 1 min at 58°C (annealing), and 1 min at 72°C (elongation). The amplified PCR products were resolved in 5% PAGE and stained with ethidium bromide. For real-time PCR analysis, cDNA was synthesized as described before, using equal amounts of RNA. The reaction was performed in 25 μ l using the fluorescent dye SYBR Green Master mix (Applied Biosystems) and a mixture of 5 pmol of reverse and forward primers. The primers used were the same as for semiquantitative PCR. Quantification was performed on an ABI PRISM 7900 sequence detection system (Applied Biosystems). PCR cycles proceeded as follows: initial denaturation for 10 min at 95°C, then 40 cycles of denaturation (15 s, 95°C), annealing (30 s, 60°C), and extension (30 s, 60°C). The melting-curve analysis showed the specificity of the amplifications. Threshold cycle, which inversely correlates with the target mRNA level, was measured as the cycle number at which the reporter fluorescent emission appears above the background threshold (data not shown). The relative mRNA levels were estimated by the standard method using housekeeping gene β -actin as the reference gene. All of the PCRs were performed in triplicate.

Immunofluorescence and immunohistochemistry

The animals were perfused through the left ventricle with saline solution, followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 15 min. The brains were removed and cryoprotected by soaking in 30% sucrose solution in phosphate buffer until they sank. Parallel series of 40- μ m thick coronal sections were obtained in a freezing microtome. Sections from control and experimental animals were processed with the same solutions and processing times over the same experimental sessions. Sections were rinsed in 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) (TBS). After three washes in TBS, the sections were incubated for 3 h in blocking solution (10% goat or rabbit serum, 0.3% Triton X-100 in TBS), and then for 48 h at 4°C in the following primary Abs: rat anti-F4/80 (1/50; Serotec) and anti-HO-1 (1/100; Stressgen). Sections were rinsed in TBS and washed three times and then incubated with secondary Abs for 45 min: Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit or Alexa Fluor 488 goat anti-rat at 1/100 dilution (Invitrogen). Immunoreagents were diluted in 1% goat or rabbit serum and 0.2% Triton X-100 in TBS. The appropriate dilution for each primary Ab was tested and optimized in preliminary experiments. Control sections were run following identical protocols but omitting the primary Ab. Sections were mounted on gelatin-coated slides, air-dried, and finally dehydrated in graded alcohols, cleared in xylene, and cover-slipped. The fluorescence images were captured using appropriate filters in a Leica DMIRE2TCS SP2 confocal microscope (Nussloch). The lasers used were Ar 488 nm for green fluorescence and Ar/HeNe 543 nm for red fluorescence. Lectin immunostaining was performed on floating sections (30 μ m). In brief, sections were washed four times in buffer 0.1 M PB containing 0.1% Triton X-100 and 0.2% BSA, treated with 1% H₂O₂ for 15 min to block endogenous peroxidase,

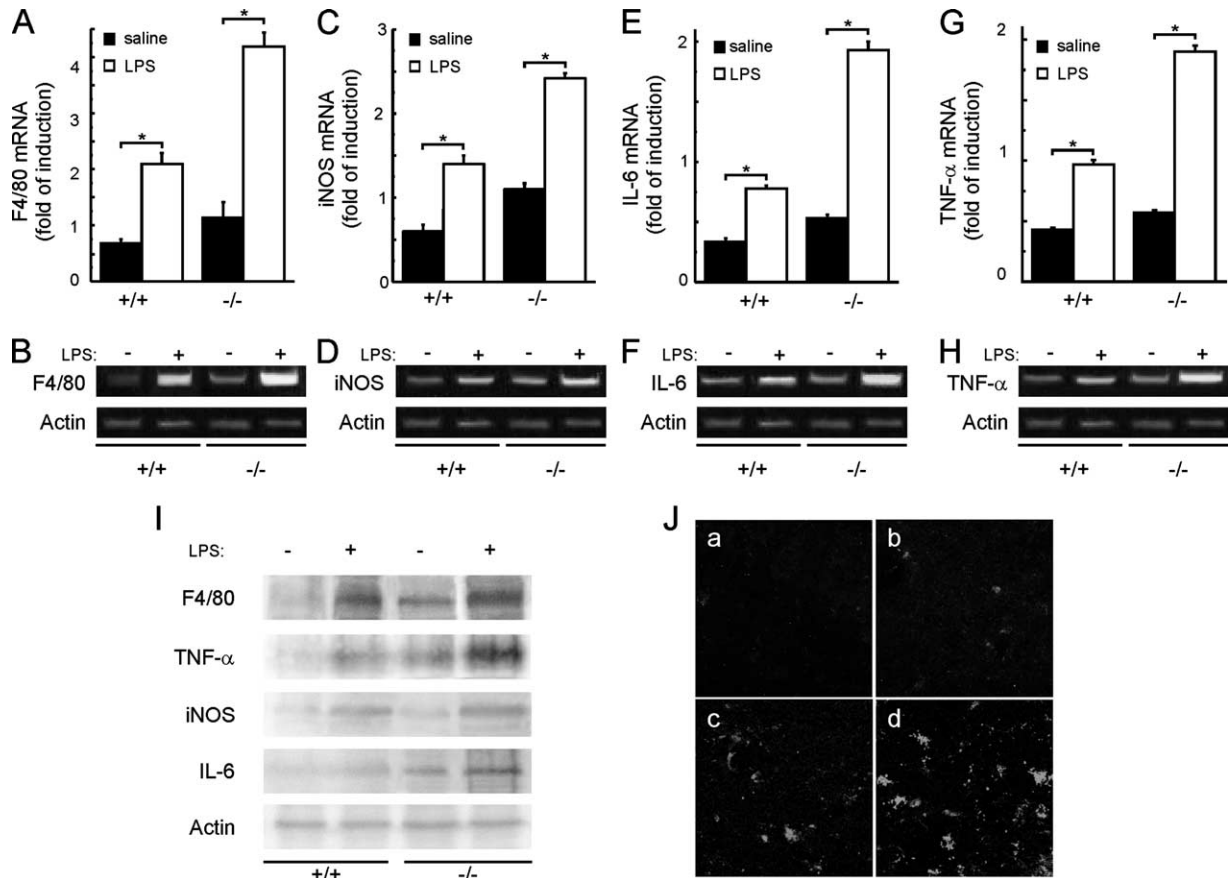


FIGURE 1. Nrf2-deficient mice exhibit enhanced microglial activation in hippocampus. Nrf2 knockout and wild-type littermate mice were injected i.p. with 1 mg/kg LPS. After 7 days, mRNA levels were analyzed for F4/80 (A and B), iNOS (C and D), IL-6 (E and F), and TNF- α (G and H). A, C, E, and G, Data from quantitative RT-PCR. Bars represent the mean \pm SD from six mice. Asterisks denote statistically significant differences between Nrf2-null (-/-) and wild-type (+/+) groups. B, D, F, and H, Representative acrylamide gels showing amplification by semiquantitative RT-PCR. I, Protein levels of these inflammation markers 6 h after LPS injection. J, Immunofluorescence showing F4/80-stained cells in hippocampus CA2 region, 7 days after injection of saline in wild-type (a) and Nrf2-null (b) mice or 7 days after injection of LPS in wild-type (c) and Nrf2-null (d) mice.

and rinsed three times in the same buffer. Sections were incubated with biotinylated tomato lectin (1/200; Sigma-Aldrich) 4–6 h at room temperature and overnight at 4°C. Development was conducted by the ABC method (Pierce), and immunoreactivity visualized by 3,3'-diaminobenzidine oxidation as chromogen with nickel enhancement.

Immunoblotting

Hippocampi were removed rapidly and homogenized on ice with lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5); 137 mM NaCl; 20 mM NaF; 1 mM sodium pyrophosphate; 1 mM Na_3VO_4 ; 1% Nonidet P-40; 10% glycerol; 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride; and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin). BV2 cells were lysed in the same buffer. Protein extracts were cleared by centrifugation and 30 μg protein were resolved by SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). Blots were analyzed with the appropriate Abs: anti-Nrf2 (1/1000; Santa Cruz Biotechnology); anti-HO-1 (1/2000; Millipore); anti-TNF- α , anti-L6, and anti-iNOS (1/1000; Abcam). Appropriate peroxidase-conjugated secondary Abs (1/10,000) were used to detect the proteins of interest by ECL.

Image analysis, quantification, and statistics

Different band intensities corresponding to immunoblot detection of protein samples and RT-PCR results were quantified using the Image J program (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Cytometry experiments were represented using the WinMDI program (Scripps Institute, La Jolla, CA). Real-Time PCR data were analyzed using the Sequence Detector Software SDS 2.0 (Applied Biosystems). The values in graphs correspond to the mean \pm SD of at least three samples. Student's *t* test was used to assess differences between groups. Asterisks indicate statistically significant differences with $p < 0.05$.

Results

Nrf2-null mice exhibit exacerbated brain inflammation in response to LPS

We analyzed markers of neuroinflammation in hippocampi of both wild-type and Nrf2 knockout mice submitted to a sublethal dose of LPS (1 mg/kg) administered i.p. As shown in Fig. 1, A and B, first we determined mRNA levels of F4/80, a gene selectively expressed in microglia/macrophages. One week after the LPS inoculation (see later for a time-course analysis) we found that in wild-type mice the mRNA levels of F4/80 were increased by 2-fold in hippocampus. Interestingly, the Nrf2-deficient mice exhibited a greater sensitivity to LPS, achieving \sim 4-fold increase in hippocampal F4/80 mRNA levels. The specificity of F4/80 was confirmed by double immunofluorescence with F4/80 and Iba-1 Abs, the latter to unequivocally identify microglia/macrophages. Indeed more than 95% of the stained cells were positive for both Ags (data not shown).

Then, we analyzed the expression of other genes that are indicative of inflammation, such as iNOS (Fig. 1, C and D), IL-6 (Fig. 1, E and F), and TNF- α (Fig. 1, G and H). mRNA levels for these markers were also enhanced in the Nrf2-null mice treated with LPS. The protein levels of these inflammation markers were also increased to a higher extent in the Nrf2-null mice compared with control mice following 6 h after LPS injection, as shown in Fig. 1I.

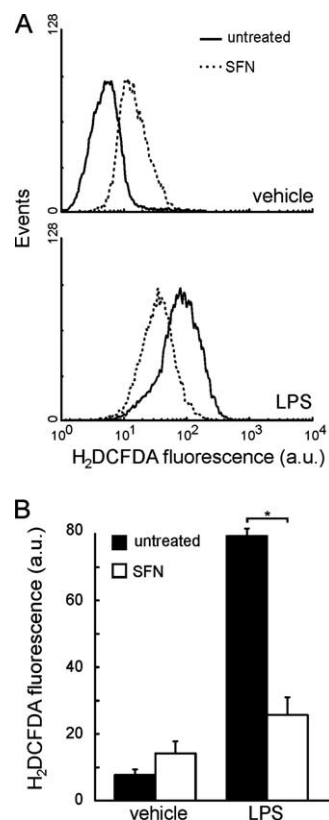


FIGURE 2. SFN modulates the oxidative response in BV2 cells. Cells were treated for 16 h with 10 μ M SFN in medium with 0.5% serum. Then, cells were preincubated for 1 h with 10 μ M H₂DCFDA, treated for 2 h with 1 mg/ml LPS and analyzed by flow cytometry. *A*, Representative samples from three different experiments for each condition are shown. *B*, Quantification of the effect of the SFN in the reduction of ROS levels in microglia. Results are expressed as arbitrary units of H₂DCFDA fluorescence. Each value corresponds to the mean \pm SD from three samples of 10,000 cells. Differences between untreated and SFN-treated groups were statistically significant with $p < 0.05$.

Results from microglia-enriched cultures obtained from both mice genotypes submitted to LPS (1 mg/ml) provided similar trends in iNOS, IL-6, and TNF- α mRNA levels as those just commented for hippocampus, thus, suggesting that the inflammation markers were produced, at least in part, by activated microglia (data not shown).

Immunofluorescence analysis of hippocampal sections from the same experimental conditions evidenced an increase in the number of F4/80 immunoreactive cells that was more pronounced in the Nrf2-deficient mice than in control mice (Fig. 1*J*). Therefore there was a correlation between the increase in inflammatory markers and the increase in microglia. Taken together, these results indicate that Nrf2-null mice exhibit exacerbated inflammatory response to LPS that correlates with increased microglial density in hippocampus.

Microglia exhibit redox regulation by Nrf2 in response to LPS

A hallmark of microglial activation is the production of hydrogen peroxide and other ROS in response to pathogens. We used the microglial cell line BV2 to determine whether SFN might modulate ROS production in response to LPS. BV2 cells were serum-starved for 16 h and treated at the same time with SFN. Then, cells were loaded with the ROS sensitive fluorescent probe H₂DCFDA, submitted to LPS for 2 h and analyzed by flow cytometry. As shown in Fig. 2, *A* and *B*, LPS promoted a strong oxidation of the fluorophore (\sim 7-fold). SFN alone induced a small oxidation of this dye (\sim 2-fold over the basal level) that we ascribe to the tendency of these cells to react against most external stimuli with a respiratory burst. Interestingly, SFN pretreatment significantly attenuated LPS-induced ROS production (\sim 4-fold). These results indicate that LPS induces an oxidant response in BV2 cells and that SFN significantly attenuates this process.

Several studies have shown that the transcription factor Nrf2 is regulated by SFN in other cell models. To determine whether this isothiocyanate regulates the Nrf2 pathway in microglia, BV2 cells were transfected with a luciferase reporter construct harboring three ARE (ARE-LUC) of the mouse HO-1 gene promoter (*hmx1*). Cells were also cotransfected, as described in Fig. 3, *A*

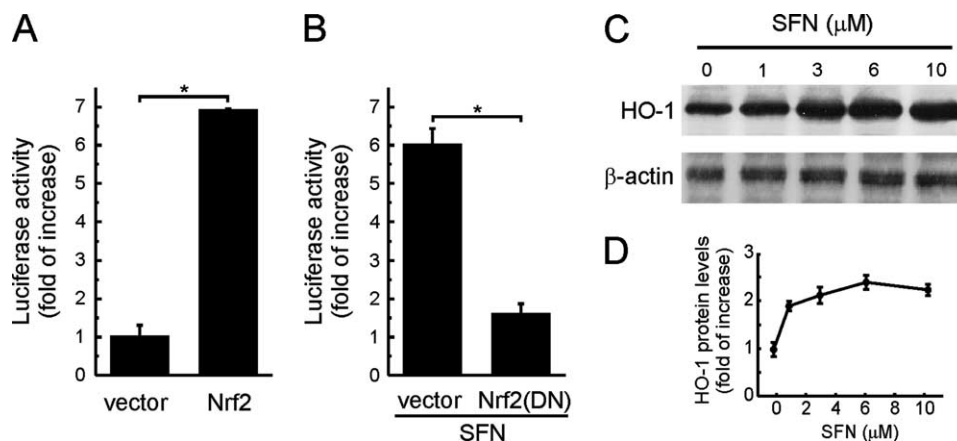
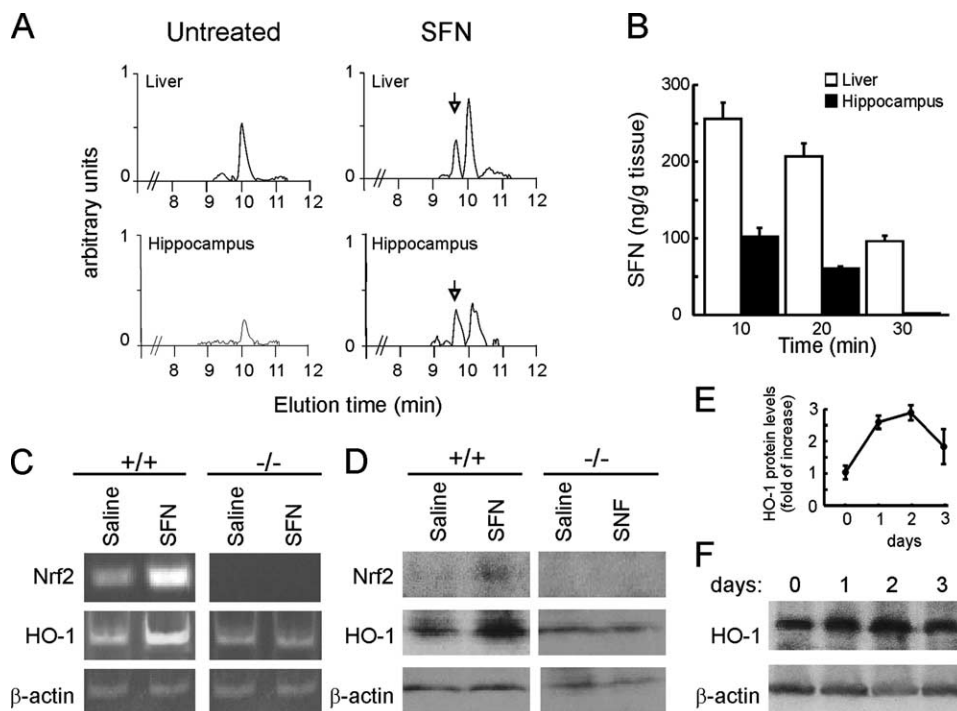


FIGURE 3. The Nrf2 pathway is functional in microglial cells. *A*, BV2 cells were cotransfected with either empty vector or Nrf2 wild-type vector (pcDNA 3.1/V5HisB-mNrf2) and a reporter construct for Nrf2 transactivating activity (ARE-LUC) containing 3 tandem sequences of the mouse *hmx1* ARE. After 24 h, cells were analyzed for luciferase activity. *B*, BV2 cells were cotransfected with either empty vector or expression vector for dominant negative Nrf2 mutant (pEF- Δ Nrf2). After 6 h, cells were treated with 10 μ M SFN and maintained for 16 h until analysis for luciferase activity. Bars represent the mean \pm SD from three samples. *C*, Representative immunoblot showing HO-1 protein levels in BV2 cells treated with SFN. Cells were serum-starved for 16 h and simultaneously treated with 1–10 μ M SFN and analyzed for HO-1 protein levels. Upper panel, anti-HO-1 Ab; lower panel, anti- β -actin Ab, showing similar protein load per lane. *D*, Quantification of HO-1 protein levels in *C* after normalization by β -actin levels. Similar results were obtained in two additional immunoblots.

FIGURE 4. SFN activates the Nrf2/HO-1 axis in hippocampus. **A**, Representative samples of liver and hippocampus used to determine SFN levels in liver and hippocampus by HPLC 10 min after a single i.p. injection of 50 mg/kg. The arrows indicate the peak identified as SFN by UV absorbance. **B**, Kinetic analysis of SFN levels in liver and hippocampus analyzed as in **A**. Bars indicate mean \pm SD of six mice per time point. **C** and **D**, Mice were submitted to one i.p. injection of 50 mg/kg SFN. After 16 h, mRNA (**C**) and protein (**D**) levels were analyzed in the hippocampi of wild-type (+/+) and Nrf2 knock-out (-/-) mice. **E**, Quantification of HO-1 protein levels in **F** after normalization by β -actin levels. Similar results were obtained in two additional immunoblots. **F**, Representative immunoblot showing a time-course analysis of HO-1 protein levels in wild-type mice after one i.p. injection of 50 mg/kg SFN.



and **B**, with either a control empty vector, or expression vectors for Nrf2 or a dominant negative Nrf2 mutant. Nrf2 overexpression induced a 6-fold increase in ARE activity (Fig. 3A). Treatment with SFN for 16 h resulted in a 6-fold increase in ARE activation as well. Moreover, SFN-induced activation of ARE was drastically blocked in cells cotransfected with the Nrf2 dominant negative mutant.

In additional experiments, we analyzed the effect of SFN on HO-1 protein levels. We chose this protein because it is a prototypic antioxidant enzyme, regulated by Nrf2, and it has been implicated in modulation of macrophage activity. BV2 cells were serum-starved for 16 h and stimulated with the indicated concentrations of SFN. As shown in Fig. 3, **C** and **D**, HO-1 protein levels increased 2–3-fold following treatment with 6–10 μ M SFN. As it will be commented in *Discussion*, this modest induction is very relevant to achieve a neuroprotective and immunomodulatory effect without compromising cell viability.

Therefore, these genetic and pharmacologic approaches show that microglia has a functionally responsive Nrf2 pathway and that SFN regulates this process.

SFN activates HO-1 expression and attenuates microglial activation in the hippocampus

Encouraged by the observation in Nrf2-null mice that Nrf2 is needed to prevent the LPS-enhanced microglial activation and by the finding that SFN activates the Nrf2 antioxidant response in vitro, we sought to analyze whether SFN might attenuate the microglial response in vivo as well. First, by HPLC analysis (14), we obtained evidence that SFN passes the blood brain barrier. As shown in Fig. 4A, untreated mice exhibited an unspecific peak at 10 min elution in both liver and hippocampus extracts. Interestingly, SFN-treated mice (10 min after i.p. injection of 50 mg/kg SFN) exhibited an additional elution peak at 9.5 min that was identified by UV absorbance as SFN. As shown in Fig. 4B, in

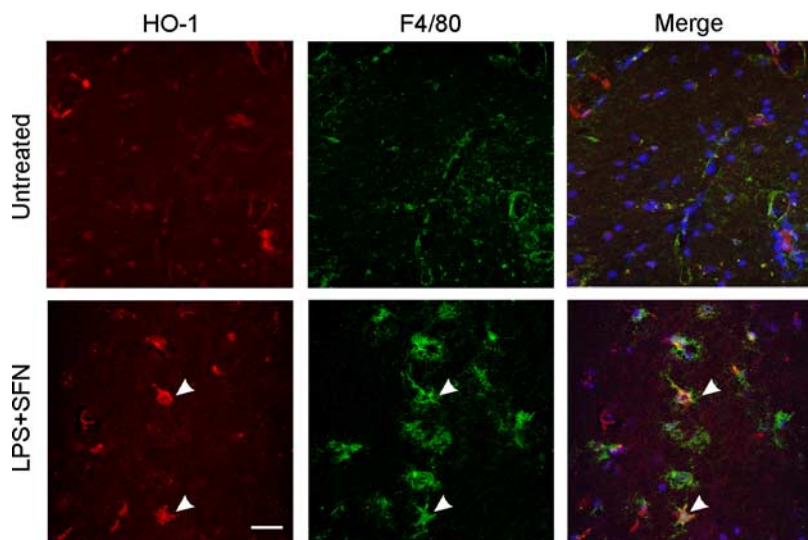


FIGURE 5. Double immunofluorescence with anti-HO-1 (red) and anti-F4/80 (green) Abs showing that a fraction of microglia/macrophages showed increased HO-1 protein levels in response to SFN. Note the reticular and membrane distribution of HO-1. Double immunofluorescence was done in 40- μ m thick coronal sections of hippocampi stained with the indicated Abs and counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole. *Upper panels*, Control animals injected with saline. *Lower panels*, Mice received one i.p. injection of 1 mg/kg LPS 3 days before analysis, and one i.p. injection of 50 mg/kg SFN, 2 days before analysis, to stimulate HO-1 gene expression. Arrows point microglial cells expressing HO-1. Bar indicates 100 μ m.

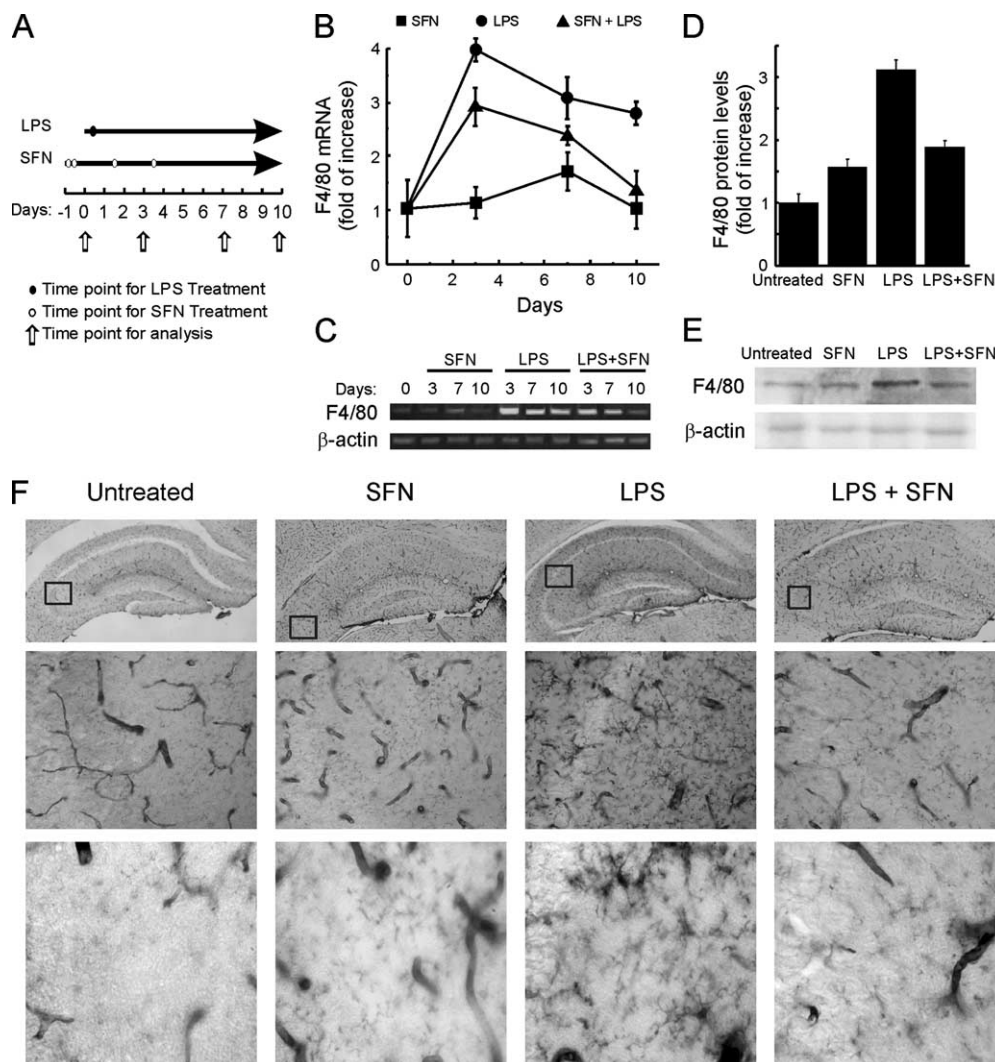


FIGURE 6. SFN attenuates the LPS-induced microglial infiltration to hippocampus. **A**, Experimental protocol of SFN and LPS administration. Mice received two SFN i.p. injections (50 mg/kg) 8 h apart from each other (day -1) and reinforcement doses at days 1 and 3. LPS (1 mg/kg) was injected in a single dose at day 0. **B**, Time-course analysis by real-time PCR of F4/80 mRNA levels in hippocampi of mice submitted to LPS, SFN, or LPS+SFN as indicated in **A**. Values correspond to F4/80 mRNA levels normalized by β -actin mRNA levels in the same extract. Each point is the mean \pm SD from six mice. **C**, Representative acrylamide gel showing F4/80 mRNA levels detected by semiquantitative RT-PCR. *Upper panel*, F4/80 mRNA. *Lower panel*, β -actin mRNA. **D**, Quantification of F4/80 protein levels in **E** after normalization by β -actin levels. Similar results were obtained in two additional immunoblots. **E**, Representative immunoblot showing F4/80 protein levels at day 7 of protocol described in **A**. **F**, Immunohistochemistry on 40- μ m coronal sections of hippocampi stained with tomato lectin, which is an effective marker of vessels and microglial cells in rodents. Mice were submitted to the SFN/LPS protocol of **A**, and analyzed at day 7. *Upper panels*, general view of left hippocampus. *Middle panels*, detail of squared regions in *upper panels* showing microglia and roughly similar microvessel density.

both organs maximum SFN levels were observed following 10 min after SFN injection and were still observed after 30 min, although liver levels were consistently much higher than hippocampal levels.

Then, we analyzed whether the amount of SFN that reaches the brain is sufficient to activate Nrf2 signaling. Sixteen hours following one single i.p. injection of 50 mg/kg SFN provoked in hippocampus a 3–4-fold increase in mRNA levels (Fig. 4C) and a 2-fold increase in protein levels (Fig. 4D) of Nrf2 and HO-1 in wild-type but not in Nrf2-null mice. Furthermore, HO-1 protein levels remained elevated at least 2 days (Fig. 4, *E* and *F*). Nrf2 protein levels seemed to increase less than mRNA levels. This difference is most likely due to the fact that Nrf2 protein and mRNA have different turnover kinetics. In fact, even dissociated from Keap1, Nrf2 has a very short half-life (15).

The induction of the Nrf2/HO-1 axis in hippocampus of SFN-treated mice included but was not limited to microglia. To deter-

mine whether the induction of HO-1 expression took place in microglia, we performed immunofluorescence studies on 40- μ m thick hippocampus coronal sections of mice submitted to 1 injection of LPS (1 mg/kg; 3 days before animal perfusion) and 1 injection of SFN (50 mg/kg; 1 day before perfusion). These conditions were chosen to optimize microglial activation and HO-1 induction because LPS alone did not substantially increase HO-1 protein levels (data not shown). We could not detect Nrf2 reliably by immunofluorescence because commercially available polyclonal Abs are not specific enough. In fact, they cross-react in immunoblots with several unidentified proteins (16). To circumvent this problem, we analyzed HO-1 protein levels in response to SFN, which should provide an indirect evidence of Nrf2 signal activation. As shown in Fig. 5, double immunofluorescence with anti-F4/80 and anti-HO-1 Abs indicated that a fraction of the cells stained with the F4/80 Ab were also costained with HO-1 Ab representing a microglia/macrophage subpopulation that induces the

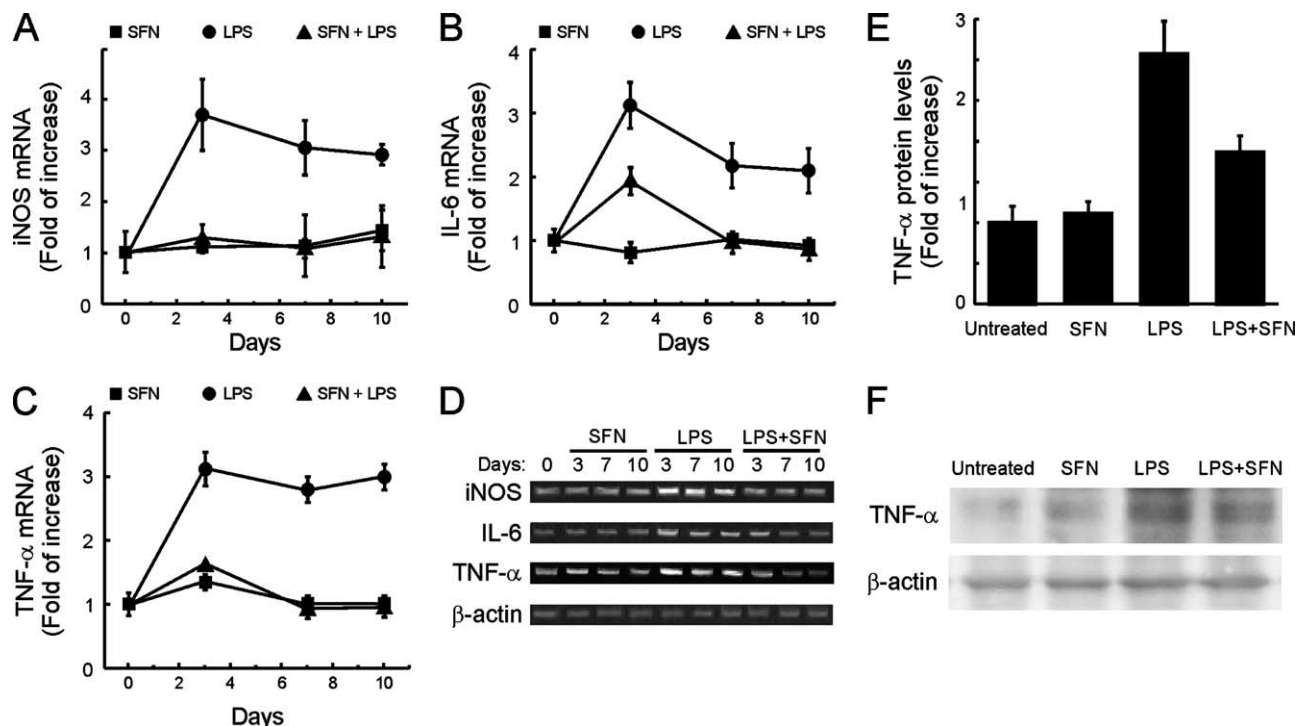


FIGURE 7. SFN attenuates LPS-induced inflammation in hippocampus. Mice were submitted to the SFN/LPS protocol of Fig. 5 and sacrificed at the indicated time points. *A*, *B*, and *C*, Quantification of hippocampal iNOS, IL-6, and TNF- α mRNA levels. Values correspond to iNOS, IL-6, and TNF- α mRNA levels normalized by β -actin mRNA levels in the same extracts. Each point is the mean \pm SD from six mice. *D*, Representative acrylamide gel showing iNOS, IL-6, TNF- α , and β -actin mRNA levels detected by semiquantitative RT-PCR. *E*, Quantification of TNF- α protein levels in *F* after normalization by β -actin levels. Similar results were obtained in two additional immunoblots. *F*, Representative immunoblot showing TNF- α protein levels at day seven.

Nrf2/HO-1 axis in response to SFN. In contrast, we found HO-1 positive cells that were not stained with the F4/80 Ab, indicating that other cell types of the hippocampus are also responsive to SFN.

Several schedules and doses of SFN were tested to achieve a steady increase in hippocampal HO-1 protein levels. SFN did not show evidence of toxicity even at the very high dose of 50 mg/kg. For the purpose of this study and considering that one i.p. injection of 50 mg/kg SFN provided increased HO-1 protein levels for over 2 days (Fig. 4, *E* and *F*), we used the protocol depicted in Fig. 6A. This protocol consisted of two i.p. injections of 50 mg/kg at 8-h interval (day -1) and one reinforcement dose at days 1 and 3.

Then, we determined whether SFN might decrease the LPS-induced increase in microglia/macrophages in hippocampus. First, we analyzed the hippocampal mRNA levels of F4/80. As shown in Fig. 6, *B* and *C*, LPS promoted a 4-fold increase of this marker that was maximal after 3 days and was still noticeable at day 10. By contrast, mice submitted to the SFN administration protocol exhibited a lower increase of F4/80 mRNA levels (1.5-fold) following 3 days of the LPS challenge and this increase was not statistically significant after 10 days. Similar results were obtained when we analyzed F4/80 protein levels at day 7. As shown in Fig. 6, *D* and *E*, F4/80 protein levels were about 3-fold higher in the LPS-treated mice but decreased to less than 2-fold in the SFN cotreated mice.

In additional experiments, we stained hippocampal sections with tomato lectin, which recognizes glycoproteins selectively expressed in microglia and endothelium. Microvessel density was similar under the four experimental conditions indicating that these treatments do not produce gross microvascular alter-

ations. Regarding microglia, mice injected with saline or SFN did not display a significant difference in staining with this dye in the areas between vessels (Fig. 6F), indicating that there is not an increase in this cell type. By contrast, mice submitted to one i.p. dose of LPS exhibited strong microglial activation in hippocampus even after 7 days. This could be observed by the existence of microglial cells in areas between vessels. On the contrary, mice submitted to the SFN protocol were refractory to the effect of LPS. Therefore, these results indicate that mice submitted to the SFN protocol were protected from LPS-induced microgliosis.

Considering that the Nrf2-knockout mice displayed enhanced production of iNOS, and of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in response to LPS (Fig. 1), we sought to investigate whether SFN might also modulate these parameters as well as it did with the F4/80 microglial marker in hippocampus. As shown in Fig. 7, *A* and *D*, hippocampal iNOS mRNA levels reached a maximal 2-fold increase 3 days after the LPS inoculation and then dropped slightly during the following days. By contrast, animals pretreated with SFN according to the protocol in Fig. 6A exhibited no iNOS mRNA enhancement at that or later times. These results indicate that SFN was able to completely abrogated LPS-induced increase in this transcript in the animals submitted to SFN, implying that activation of the Nrf2/HO-1 axis provides protection against nitrosative stress.

mRNA levels of proinflammatory cytokines IL-6 (Fig. 7, *B* and *D*) and TNF- α (Figs. 7C and 6D) induced by LPS administration were also decreased in the SFN-treated mice. In control mice, LPS induced a 2-fold increase in IL-6 mRNA levels at 3 and 7 days, respectively. TNF- α mRNA levels were maximal (3-fold) at 3 days after the LPS injection and the increase was maintained over

the following days. However, mice submitted to SFN were very refractory to the production of these cytokines. In fact, SFN prevented almost completely the LPS-induced increase in mRNA levels of IL-6 and TNF- α . In additional experiments, we analyzed TNF- α protein levels by immunoblot. As shown in Fig. 7, *F* and *E*, a 2-fold increase in TNF- α protein levels was detected after 7 days from the LPS insult. By contrast, the SFN treatment significantly reduced these levels to values slightly higher than those of control and SFN-treated mice.

Discussion

Microglial cells activate a complex response that includes the activation of NADPH oxidase and the subsequent release of extracellular and intracellular ROS, in response to pathogens or neurotoxins. ROS act as second messengers to amplify the inflammatory function of microglia (5) but at the same time they activate the transcription factor Nrf2, which leads to expression of antioxidant genes and restores redox homeostasis (17). We hypothesize that the restoration of redox homeostasis is an essential part in down-modulation of reactive microglia. In Fig. 8, we propose a model on how Nrf2 might participate in a physiological negative loop to bring microglia back to the resting state following its activation. A corollary of this model is that, by activating Nrf2 pharmacologically, it should be possible to anticipate or reinforce the inhibitory events that lead to microglial down-regulation and, thus, modulate the pathological neuroinflammatory response that characterizes several neurodegenerative diseases.

Therefore, here we have tested this hypothesis by using a well-established model of neuroinflammation based on i.p. administration of the endotoxin LPS and the analysis of inflammation in hippocampus. We found that Nrf2 knockout mice exhibited both enhanced expression of the microglia marker F4/80 and increased number of microglia/macrophage cells, following LPS administration. The experiments conducted in this study do not allow to discriminate whether this increase resulted from macrophage infiltration, or was a consequence of migration from other brain locations, or proliferation of resident microglial cells. Experiments conducted by Simard et al. (18), using stem cells genetically modified to express the green fluorescence protein, elegantly demonstrated that circulating monocytes are able to infiltrate brain parenchyma and differentiate into microglial cells. In addition, the inflammation markers iNOS, IL-6, and TNF- α were increased compared with wild-type littermates. These observations are consistent with a previous report of Biswal's group (7, 8) who demonstrated that lung macrophages of Nrf2-null mice exhibit an exacerbated inflammatory response to LPS and cigarette smoke extracts. Not all cells that were positive for HO-1 were stained with the F4/80 Ab, suggesting that SFN induced the Nrf2/HO-1 axis in other cell types as well including neurons or astroglia. Considering that astrocytes cooperate in the release of proinflammatory cytokines the attenuation of the inflammatory response by SFN may act in part through the inhibition of astroglial release of cytokines. In fact, other authors have suggested that the Nrf2/HO-1 axis is particularly relevant in astroglia (19).

Numerous evidences generated for the past 2–3 years strongly implicate Heme degradation products CO and biliverdin, generated by HO-1, in immunomodulation of macrophages including microglia in vitro (20–22). Thus, CO inhibits NADPH oxidase (23, 24), the main enzyme responsible for microglial ROS release, and TLR4, involved in LPS signaling (25).

Based on these observations, it would have seemed logical to use regulators of HO activity to modulate neuroinflammation.

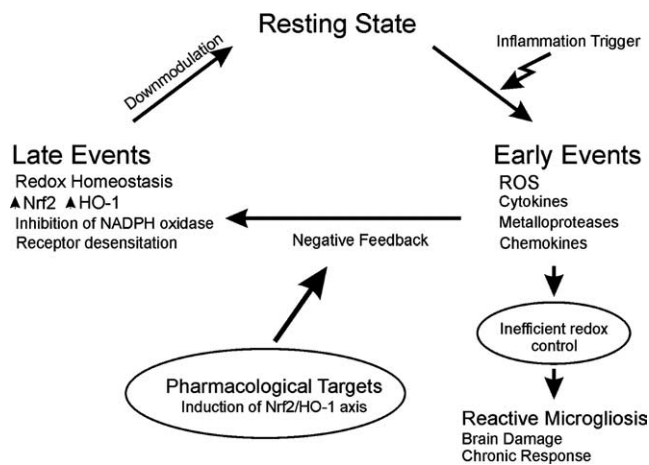


FIGURE 8. Model proposed for modulation of microglia by the Nrf2/HO-1 axis. Pathogenic or neurotoxic insults (LPS) interact with pattern recognition receptors (TLR4) and trigger the early release of NADPH oxidase-mediated ROS and other proinflammatory factors. The increase of intracellular ROS is then detected by Nrf2, guardian of redox homeostasis, which activates a set of antioxidant and anti-xenobiotic genes, including HO-1. This late antioxidant response restores the redox balance, inhibits NADPH oxidase and down-regulates TLR4, driving active microglia back to the resting state. Genetic variability in key antioxidant enzymes, environmental alterations, or just the normal decline of redox homeostasis that occurs with aging leads to inefficient redox control and reduced capacity to down-modulate active microglia. This fact results in microglial activation and brain damage. Pharmacologic action on the Nrf2/HO-1 axis reinforces or restores microglial redox control, strengthens the negative loop, and assists in reduction of neuroinflammation.

However, this possibility has remained elusive because the canonical regulators of HO, Coprotoporphyrin and Sn-protoporphyrin, do not pass the blood brain barrier efficiently (data not shown and 26, 27). Therefore, we have focused on the pharmacological regulation of Nrf2, a transcription factor that activates HO-1 expression and might provide an additional antioxidant protection through the induction of other antioxidant phase II genes.

Initially, we attempted to activate the Nrf2/HO-1 axis with carnosol, a phenolic diterpene extracted from rosemary, which disrupts the Nrf2/Keap1 complex (28). Despite our excellent results in vitro, we could not get a significant activation of Nrf2/HO-1 in vivo. This is most likely due to low bioavailability of phenolic compounds. Therefore, we used the alkaloid isothiocyanate SFN, which according to our present results readily penetrates into the brain after peripheral administration. SFN has been used to down-regulate macrophage activation in in vitro models of inflammation (11, 29), and very recently it has been used in mice to demonstrate a role in modulation of the blood brain barrier permeability in brain microvessels (10).

First, we showed that SFN effectively counteracts LPS-induced ROS in BV2 microglial cells. Next, we analyzed the effect of SFN on HO-1 protein levels in the BV2 microglial cell line and in hippocampus. Maximal 2–3-fold stimulation was observed in both experimental settings. Furthermore, the response was blunted in cells transfected with the dominant negative Nrf2 construct and in Nrf2-null mutant mice, demonstrating the role played by this transcription factor in the SFN effects. Although the increase in HO-1 promoted by SFN may seem small at first glance, it is very relevant to achieve a neuroprotective and immunomodulator effect without compromising cell viability. For the past years, there has been some controversy on whether heme degradation in the brain by

HO-1 prevents or rather contributes to neurodegeneration. Although low levels of CO and biliverdin/bilirubin appear to be neuroprotective, high CO levels may uncouple the mitochondrial respiratory chain and high bilirubin levels, as those found in neonatal jaundice, result in damage to basal ganglia, hippocampus, and cranial nerve nuclei (30, 31). Most importantly, free iron is not efficiently cleared from the brain and contributes to generation of ROS by Fenton reaction (32). In contrast, HO-2 knockout mice display a significant reduction of brain bilirubin and the neurons of these animals are more sensitive to H_2O_2 than matched control wild-type littermates, suggesting a role of bilirubin in neuroprotection against oxidative stress (33). Oxidant scavenging by bilirubin implies its spontaneous conversion back to biliverdin and its recycling through catalysis by biliverdin reductase. According to Sedlak and Snyder (33) in this cycle nanomolar concentrations of bilirubin counteract the oxidative effect of micromolar concentrations of H_2O_2 . Bilirubin is also an excellent scavenger for endogenous NO and prevents peroxynitrite formation (34, 35). Therefore, nowadays it is widely accepted that a moderate activation of heme catabolism is neuroprotective (36). For this reason, the modest 2–3-fold increase in HO-1 protein levels reported with our protocol may be within the window of therapeutic benefit.

In vivo administration of SFN was able to decrease microglial activation and the up-regulation of inflammatory markers following endotoxin injection. The effect of SFN on the kinetic response to LPS was slightly different for the inflammation parameters tested in this study. Although iNOS and TNF- α responses were totally abrogated by SFN at 3 days, the F4/80 and IL-6 rise was only partially inhibited at that time point. We do not have a fully satisfactory explanation for these observations but we speculate that part of the proinflammatory markers studied may derive from different cell types including astroglia. Moreover, as shown in Fig. 5, F4/80 microglia included both HO-1-expressing and HO-1-negative subpopulations, suggesting the existence of microglia subsets with different sensitivity to SFN. In any case, SFN significantly reduced the consequences of LPS at 3 days postinjection and totally abrogated the inflammatory response at longer times.

To endorse this kind of treatment into the clinic, a critical issue that needs to be addressed in the near future is the determination of dose and dosing protocol of SFN or other phase II inducers that might have a therapeutic use. In this study, we chose the inoculation of 50 mg/kg because mice did not show evidence of toxicity, even at this very high dose. However, lower doses may be useful too. A recently published study by Zhao et al. (10) show Nrf2 activation in brain by 5 mg/kg SFN. We have corroborated that this dose activates HO-1 expression in brain equally or even better than in liver (data not shown).

In summary, we have shown that pharmacological up-regulation of the transcription factor Nrf2, the guardian of redox homeostasis, which enhances HO-1 activity, is a feasible strategy to modulate an acute inflammatory response in the brain. Moreover, our results open the possibility that this therapeutic intervention might be useful in treatment of pathologies that involve chronic inflammation, such as that observed in some neurodegenerative diseases.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Ana M^a Martín-Moreno for establishing primary microglial cultures.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308: 1314–1318.
- Block, M. L., and J. S. Hong. 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog. Neurobiol.* 76: 77–98.
- Babior, B. M. 2000. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* 109: 33–44.
- Pawate, S., Q. Shen, F. Fan, and N. R. Bhat. 2004. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferon- γ . *J. Neurosci. Res.* 77: 540–551.
- Block, M. L., L. Zecca, and J. S. Hong. 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev.* 8: 57–69.
- Kapturczak, M. H., C. Wasserfall, T. Brusko, M. Campbell-Thompson, T. M. Ellis, M. A. Atkinson, and A. Agarwal. 2004. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am. J. Pathol.* 165: 1045–1053.
- Thimmulappa, R. K., H. Lee, T. Rangasamy, S. P. Reddy, M. Yamamoto, T. W. Kensler, and S. Biswal. 2006. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J. Clin. Invest.* 116: 984–995.
- Rangasamy, T., C. Y. Cho, R. K. Thimmulappa, L. Zhen, S. S. Srisuma, T. W. Kensler, M. Yamamoto, I. Petracek, R. M. Tuder, and S. Biswal. 2004. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J. Clin. Invest.* 114: 1248–1259.
- Fahey, J. W., Y. Zhang, and P. Talalay. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10367–10372.
- Zhao, J., A. N. Moore, J. B. Redell, and P. K. Dash. 2007. Enhancing expression of Nrf2-driven genes protects the blood brain barrier after brain injury. *J. Neurosci.* 27: 10240–10248.
- Killeen, M. E., J. A. Englert, D. B. Stolz, M. Song, Y. Han, R. L. Delude, J. A. Kellum, and M. P. Fink. 2006. The phase 2 enzyme inducers ethacrynic acid, DL-sulforaphane, and oltipraz inhibit lipopolysaccharide-induced high-mobility group box 1 secretion by RAW 264.7 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316: 1070–1079.
- Heiss, E., and C. Gerhauser. 2005. Time-dependent modulation of thioredoxin reductase activity might contribute to sulforaphane-mediated inhibition of NF-kappaB binding to DNA. *Antioxid. Redox Signal.* 7: 1601–1611.
- Itoh, K., T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, et al. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236: 313–322.
- Liang, H., Q. Yuan, and Q. Xiao. 2005. Purification of sulforaphane from *Brassica oleracea* seed meal using low-pressure column chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 828: 91–96.
- McMahon, M., N. Thomas, K. Itoh, M. Yamamoto, and J. D. Hayes. 2004. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 domain and the redox-insensitive Neh6 domain. *J. Biol. Chem.* 279: 31556–31567.
- Nguyen, T., P. J. Sherratt, P. Nioi, C. S. Yang, and C. B. Pickett. 2005. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J. Biol. Chem.* 280: 32485–32492.
- Kraft, A. D., J. M. Lee, D. A. Johnson, Y. W. Kan, and J. A. Johnson. 2006. Neuronal sensitivity to kainic acid is dependent on the Nrf2-mediated actions of the antioxidant response element. *J. Neurochem.* 98: 1852–1865.
- Simard, A. R., and S. Rivest. 2004. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J.* 18: 998–1000.
- Kraft, A. D., D. A. Johnson, and J. A. Johnson. 2004. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. *J. Neurosci.* 24: 1101–1112.
- Lee, S., and K. Suk. 2007. Heme oxygenase-1 mediates cytoprotective effects of immunostimulation in microglia. *Biochem. Pharmacol.* 74: 723–729.
- Min, K. J., M. S. Yang, S. U. Kim, I. Jou, and E. H. Joe. 2006. Astrocytes induce hemoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *J. Neurosci.* 26: 1880–1887.
- Guo, G., and N. R. Bhat. 2006. Hypoxia/reoxygenation differentially modulates NF-kB activation and iNOS expression in astrocytes and microglia. *Antioxid. Redox Signal.* 8: 911–918.
- Taille, C., J. El-Benna, S. Lanone, J. Boczkowski, and R. Motterlini. 2005. Mitochondrial respiratory chain and NAD(P)H oxidase are targets for the antiproliferative effect of carbon monoxide in human airway smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 280: 25350–25360.
- Wang, X., Y. Wang, H. P. Kim, K. Nakahira, S. W. Ryter, and A. M. Choi. 2007. Carbon monoxide protects against hyperoxia-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species formation. *J. Biol. Chem.* 282: 1718–1726.
- Nakahira, K., H. P. Kim, X. H. Geng, A. Nakao, X. Wang, N. Murase, P. F. Drain, X. Wang, M. Sasidhar, E. G. Nabel, et al. 2006. Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts. *J. Exp. Med.* 203: 2377–2389.

26. Marinissen, M. J., T. Tanos, M. Bolos, M. R. de Sagarra, O. A. Coso, and A. Cuadrado. 2006. Inhibition of heme oxygenase-1 interferes with the transforming activity of the Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 281: 11332–11346.
27. Li, M., S. Peterson, D. Husney, M. Inaba, K. Guo, E. Terada, T. Morita, K. Patil, A. Kappas, S. Ikehara, and N. G. Abraham. 2007. Interdiction of the diabetic state in NOD mice by sustained induction of heme oxygenase: possible role of carbon monoxide and bilirubin. *Antioxid. Redox Signal.* 9: 855–863.
28. Martin, D., A. I. Rojo, M. Salinas, R. Diaz, G. Gallardo, J. Alam, C. M. De Galarreta, and A. Cuadrado. 2004. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J. Biol. Chem.* 279: 8919–8929.
29. Heiss, E., C. Herhaus, K. Klimo, H. Bartsch, and C. Gerhauser. 2001. Nuclear factor κ B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* 276: 32008–32015.
30. Kapitulnik, J. 2004. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol. Pharmacol.* 66: 773–779.
31. Dennery, P. A., D. S. Seidman, and D. K. Stevenson. 2001. Neonatal hyperbilirubinemia. *N. Engl. J. Med.* 344: 581–590.
32. Lee, D. W., J. K. Andersen, and D. Kaur. 2006. Iron dysregulation and neurodegeneration: the molecular connection. *Mol. Interv.* 6: 89–97.
33. Sedlak, T. W., and S. H. Snyder. 2006. Messenger molecules and cell death: therapeutic implications. *J. Am. Med. Assoc.* 295: 81–89.
34. Mancuso, C., A. Bonsignore, E. Di Stasio, A. Mordente, and R. Motterlini. 2003. Bilirubin and S-nitrosothiols interaction: evidence for a possible role of bilirubin as a scavenger of nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* 66: 2355–2363.
35. Kaur, H., M. N. Hughes, C. J. Green, P. Naughton, R. Foresti, and R. Motterlini. 2003. Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species. *FEBS Lett.* 543: 113–119.
36. Cuadrado, A., and A. I. Rojo. 2008. Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases and brain infection. *Curr. Pharm. Design* 14: 429–442.